

---

**Strukturelle und funktionale Analyse der  
Effektordomäne des pH-abhängigen  
Einkomponentensystems CadC in *Escherichia coli***

---

**DISSERTATION**

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**SOPHIE GLORIA BUCHNER**

aus München

München

11. März 2015



**Gutachter:**

1. Prof. Dr. Kirsten Jung
2. Prof. Dr. Marc Bramkamp

**Tag der mündlichen Prüfung: 06. Mai 2015**



## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den ..... ..

(Unterschrift)

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, \*

- ☐ dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- ☐ dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- ☐ dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach .....  
und in den Nebenfächern .....  
bei der Fakultät für ..... der .....  
(Hochschule/Universität)  
unterzogen habe.
- ☐ dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den..... ..

(Unterschrift)

\*) Nichtzutreffendes streichen

**Für meine Eltern**

## **Publikation**

Teile der Abbildungen, Tabellen und Textauszüge der vorliegenden Arbeit wurden im Vorfeld in veränderter Form publiziert:

**Buchner, S., Schlundt, A., Lassak, J., Sattler, M. & Jung, K. (2015)**

Structural and functional analysis of the signal transducing linker in the pH-responsive one component system CadC of *Escherichia coli* (J. Mol. Biol., submitted)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis .....	XII
Nomenklatur.....	XIV
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Säurestressadaption in <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.2 Das Cad-System in <i>E. coli</i> .....	6
2.3 Die Regulation des Cad-Systems .....	8
2.4 Der Transkriptionsaktivator CadC.....	9
2.5 Signalweiterleitende Proteindomänen .....	13
<b>3 Aufgabenstellung.....</b>	<b>16</b>
<b>4 Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
4.1 Materialien.....	17
4.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	18
4.3 Kultivierungsverfahren .....	26
4.3.1 Bestimmung der CadC-vermittelten Signaltransduktion in vivo .....	26
4.3.2 In vivo Protein-Protein-Interaktionsstudie.....	27
4.3.3 Lysin-decarboxylase-Bestimmung (LDC-Differentialmedium) .....	27
4.3.4 Überproduktion von Proteinen.....	27
4.3.5 Dauerkulturen .....	28
4.4 Molekularbiologische und genetische Methoden .....	28
4.4.1 Plasmidisolierung.....	28
4.4.2 Modifikation von DNA.....	28
4.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	29
4.4.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	29
4.4.5 Markierung von DNA für Gel-Retardationsexperimente .....	29
4.4.6 DNA-Sequenzanalyse .....	30
4.4.7 Kompetente Zellen und Transformation .....	30
4.4.8 Konstruktion der Plasmide.....	31
4.4.9 Stammkonstruktion .....	32
4.5 Biochemische und analytische Methoden .....	33
4.5.1 Präparation von Membranproteinen und Zytosol mittels Ultraschall .....	33
4.5.2 Reinigung von Proteinen.....	34

4.5.2.1 Solubilisierung und Reinigung von CadC und CadC $\Delta$ 108-151 .....	34
4.5.2.2 Solubilisierung und Reinigung von LysP .....	34
4.5.2.3 Reinigung von löslichen CadC-Varianten .....	35
4.5.2.4 Reinigung von löslichen MalE-CadC-Varianten .....	35
4.5.2.5 Reinigung von löslichen Trx-CadC-Varianten .....	36
4.5.3 Rekonstitution CadC und LysP .....	36
4.5.4 Proteinbestimmung .....	37
4.5.5 Quervernetzungsstudien .....	37
4.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteinfärbung .....	37
4.5.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit His <sub>10</sub> - <i>Affinitätstag</i> : Western Blot .....	38
4.5.8 Gel-Retardationsexperimente .....	38
4.5.9 Messung von DNA-Bindeaffinitäten mit Biacore T200 .....	39
4.5.10 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung .....	40
4.5.10.1 Nachweis der Aktivität von CadC über kolorimetrischen Plattentest .....	40
4.5.10.2 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung nach Miller (1972) .....	41
4.5.11 Lysin-Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung .....	41
4.5.12 In vivo Studien zur Interaktion von Proteinen: Bacterial- <i>Two-Hybrid</i> System ....	42
<b>4.6 Bioinformatische Analysen .....</b>	<b>43</b>
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Charakterisierung des zytoplasmatischen Linkers in CadC .....</b>	<b>45</b>
5.1.1 Bioinformatische Analyse von CadC .....	45
5.1.2 Aminosäuresubstitutionen in der CadC-Linkerregion .....	46
5.1.2.1 Gerichtete Mutagenese in der CadC-Linkerregion .....	46
5.1.2.2 Untersuchungen zur Bildung einer transienten Helix im CadC-Linker .....	48
5.1.2.3 Charakterisierung von CadC-Hybridproteinen .....	50
5.1.2.4 Einfluss von Polyprolin-Helices und Peptidyl-Prolyl-Isomerasen .....	52
5.1.3 Variation der Linkerlänge in <i>E. coli</i> CadC .....	54
5.1.4 Posttranslationale Modifikation von CadC .....	56
5.1.5 Homodimerisierung von CadC .....	57
<b>5.2 Die Struktur der zytoplasmatischen Domäne von CadC .....</b>	<b>60</b>
5.2.1 Reinigung löslicher CadC-Varianten .....	61
5.2.2 Funktionalität löslicher CadC-Varianten .....	63
5.2.3 NMR-Spektroskopie der zytoplasmatischen Domäne von CadC .....	64
5.2.4 Röntgenkristallographie der DNA-Bindedomäne von CadC .....	72
5.2.5 CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub> liegen als Monomere vor .....	73
<b>5.3 Interaktion von CadC mit der DNA .....</b>	<b>74</b>
5.3.1 Gel-Retardationsexperimente von CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub> auf P <sub><i>cadBA</i></sub> .....	75

5.3.2 NMR-Studien zur DNA-Bindung .....	76
5.3.3 Einfluss von Aminosäuresubstitutionen auf die Interaktion mit DNA .....	80
5.3.4 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie .....	84
5.3.4.1 Interaktion von CadC <sub>1-159</sub> , CadC <sub>1-159</sub> _E30R und CadC <sub>1-159</sub> _R96A mit P <sub>cadBA</sub> ....	84
5.3.4.2 Interaktion von CadC mit der RNA-Polymerase .....	85
5.3.5 Einfluss der Lokalisation von <i>cadC</i> zu P <sub>cadBA</sub> auf die <i>cadBA</i> -Expression .....	87
5.3.6 Interaktion von CadC mit der RNAP $\alpha$ -Untereinheit .....	89
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 Der CadC-Linker ist unstrukturiert .....</b>	<b>92</b>
<b>6.2 Der CadC-Linker toleriert eine Vielzahl an Aminosäure-Substitutionen .....</b>	<b>93</b>
<b>6.3 Der CadC-Linker reagiert sensitiv auf Verkürzungen .....</b>	<b>94</b>
<b>6.4 Die DNA-Bindedomäne in CadC umfasst ein winged Helix-Turn-Helix-Motiv .....</b>	<b>95</b>
<b>6.5 Aminosäurereste in der Erkennungshelix sind in die DNA-Bindung involviert .....</b>	<b>97</b>
<b>6.6 Permanente DNA-Bindung von CadC .....</b>	<b>100</b>
<b>6.7 Der Linker beeinflusst die Disposition der DNA-Bindedomänen im CadC-Dimer nach Reizwahrnehmung .....</b>	<b>103</b>
<b>7 Ausblick .....</b>	<b>106</b>
<b>8 Literatur .....</b>	<b>108</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>122</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Säureadaption in <i>E. coli</i>	5
<b>Abbildung 2:</b> Das Cad-System in <i>E. coli</i>	7
<b>Abbildung 3:</b> Die Kristallstruktur der periplasmatischen Domäne von CadC	11
<b>Abbildung 4:</b> Vergleich des modularen Aufbaus von CadC und NarX aus <i>E. coli</i>	14
<b>Abbildung 5:</b> Prinzip des Adenylatzyklase basierten <i>Two-Hybrid</i> Systems	43
<b>Abbildung 6:</b> Domänenarchitektur von <i>E. coli</i> CadC	45
<b>Abbildung 7:</b> Einfluss der Aminosäuresubstitutionen in CadC auf die Expression des <i>cadBA</i> -Operons	47
<b>Abbildung 8:</b> Computergestützte Sekundärstrukturanalyse	48
<b>Abbildung 9:</b> Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im Motiv <sup>146</sup> PEQSPV <sup>151</sup> auf die <i>cadBA</i> -Expression	49
<b>Abbildung 10:</b> CadC_Hybrid-Varianten reprimieren die <i>cadBA</i> -Expression	51
<b>Abbildung 11:</b> Einfluss von repetitiven Prolinresten auf die <i>cadBA</i> -Expression	53
<b>Abbildung 12:</b> Deletion von Peptidyl-Prolyl-Isomerasen im Lysin-decarboxylase-Assay	54
<b>Abbildung 13:</b> Sukzessive Verkürzung und Verlängerung der CadC-Linkerregion	55
<b>Abbildung 14:</b> Spezifische CadA-Aktivität in <i>E. coli</i> MG1655 und <i>E. coli</i> DC1185 in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen	57
<b>Abbildung 15:</b> pH-abhängige Oligomerisierung von CadC/CadC und pH-abhängige Aktivierung der <i>cadBA</i> -Transkription	58
<b>Abbildung 16:</b> pH-abhängige Oligomerisierung von CadC-Δ108-151/CadC-Δ108-151	60
<b>Abbildung 17:</b> SDS-Gel nach Reinigung von CadC <sub>1-159</sub>	62
<b>Abbildung 18:</b> Komplementation von BL21(DE3)Δ <i>cadC</i> durch CadC, CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub>	64
<b>Abbildung 19:</b> <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC Spektren von CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub>	65
<b>Abbildung 20:</b> <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HNCACB-Planes der Aminosäuren 41-46 der DNA-bindenden Domäne von CadC im HNCACB-Spektrum	66
<b>Abbildung 21:</b> Die Sekundärstruktur von CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub> abgeleitet aus der sekundären chemischen Verschiebung	67
<b>Abbildung 22:</b> Die Dynamik von CadC <sub>1-159</sub> im <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N Hetero-NOE-Plot	68
<b>Abbildung 23:</b> Relaxationsdaten zur Rigidität von CadC <sub>1-159</sub>	70
<b>Abbildung 24:</b> NMR-Struktur von CadC <sub>1-107</sub>	71

<b>Abbildung 25:</b> Kristallisation von CadC <sub>1-107</sub>	73
<b>Abbildung 26:</b> Untersuchung der Oligomerisierung von CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub> mittels <i>Static light Scattering</i> .	74
<b>Abbildung 27:</b> Bindung von CadC, CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub> an P <sub>cadBA</sub> und ein Kontrollfragment ( <i>lysP</i> ) in vitro	76
<b>Abbildung 28:</b> Interaktion von CadC <sub>1-107</sub> und CadC <sub>1-159</sub> mit P <sub>cadBA</sub>	77
<b>Abbildung 29:</b> CadC <sub>1-159</sub> bindet unspezifisch an DNA	78
<b>Abbildung 30:</b> Veränderung der chemischen Verschiebung von Aminosäureresten in CadC <sub>1-159</sub> nach Zugabe von P <sub>cadBA</sub> -DNA	79
<b>Abbildung 31:</b> Einfluss von Aminosäuresubstitutionen des DNA-Bindemotivs in CadC	81
<b>Abbildung 32:</b> Komplementation von BL21(DE3)Δ <i>cadC</i> durch CadC, CadC <sub>1-107</sub> , CadC <sub>1-107</sub> _E30R, CadC <sub>1-107</sub> _R96A, CadC <sub>1-159</sub> _E30R und CadC <sub>1-159</sub> _R96A	83
<b>Abbildung 33:</b> Bindung von CadC <sub>1-159</sub> , CadC <sub>1-159</sub> _R96A und CadC <sub>1-159</sub> _E30R an die Promotorregion von <i>cadBA</i>	85
<b>Abbildung 34:</b> Interaktion von CadC und CadCΔ108-151 mit der RNA-Polymerase	87
<b>Abbildung 35:</b> Spezifische CadA-Aktivität in <i>E. coli</i> LF1, <i>E. coli</i> LF1_2 <i>cadC</i> und <i>E. coli</i> LF1_2 <i>cadC</i> _Ins	88
<b>Abbildung 36:</b> Interaktion von CadC mit der RpoA	89
<b>Abbildung 37:</b> Interaktion von CadCΔ108-151 mit der RpoA	91
<b>Abbildung 38:</b> Struktur der DNA-Bindedomäne (CadC <sub>1-107</sub> )	97
<b>Abbildung 39:</b> Lokalisation der Aminosäurepositionen in der Kristallstruktur von CadC <sub>1-107</sub> im 3D-Homologiemodell mit PhoB-spezifischer DNA ( <i>pho</i> Box), die mittels zielgerichteter Mutagenese identifiziert wurden	100
<b>Abbildung 40:</b> Modell für CadC-vermittelte Signaltransduktion nach konformationellen Veränderungen in der zytoplasmatischen Domäne	103
<b>Abbildungen des Anhangs:</b>	
<b>Abbildung A1:</b> Computergestützte Sekundärstrukturanalyse von CadC aus <i>E. coli</i> und ToxR aus <i>V. cholerae</i>	117
<b>Abbildung A2:</b> <i>Calibration-free Concentration Analysis</i> zur Bestimmung des Anteils an biologisch aktivem CadC <sub>1-159</sub> -E30R	117
<b>Abbildung A3:</b> Computergestützter Sequenzvergleich von Transkriptionsregulatoren der OmpR-Familie	118
<b>Abbildung A4:</b> Computergestützter Sequenzvergleich von CadC	121



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Materialien	17
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	18
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Plasmide	19
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Oligonukleotide	22
<b>Tabelle 5:</b> Reinigungsstudie mit löslichen CadC-Varianten	63

## Abkürzungsverzeichnis

A <sub>x</sub>	Absorption der Wellenlänge x nm
Abb.	Abbildung
Amp <sup>R</sup>	Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AR	engl. <i>acid resistance</i>
As	Aminosäure
ATR	engl. <i>acid tolerance response</i>
BACTH	engl. <i>bacterial adenylate cyclase two-hybrid</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
CAP	engl. <i>catabolite activator protein</i>
CFCA	engl. <i>calibration-free concentration analysis</i>
Cm <sup>R</sup>	Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Chloramphenicol
CSP	engl. <i>chemical shift perturbation</i>
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinase
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-P	engl. <i>elongation factor P</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
6-FAM	6-Carboxyfluorecein
GABA	γ-Aminobuttersäure
H-NS	Histon-ähnliches Nukleotid-strukturierendes Protein
IPTG	Isopropyl-1-thio-β,D-galaktopyranosid
Kan <sup>R</sup>	Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Kanamycin
K <sub>d</sub>	Dissoziations-/Bindungskonstante
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LDAO	N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid
Lrp	engl. <i>leucine-responsive protein</i>
MAD	Multiple anomale Dispersion
MBP	engl. <i>maltose-binding protein</i>
mind.	mindestens
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MU	Miller Units
ncRNA	engl. <i>non coding RNA</i>
Ni <sup>2+</sup> -NTA	N <sup>2+</sup> -Nitrilotriessigsäure
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
oNPG	ortho-nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid

P <sub>x</sub>	Promotor des Gens x
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PLP	Pyridoxalphosphat
PMF	engl. <i>proton motive force</i>
PMSF	Phenylmethan-sulfonylfluorid
RNAP	RNA-Polymerase
PP	Periplasma
p.p.m.	engl. <i>parts per million</i>
rpm	engl. <i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Helix	engl. <i>signaling helix</i>
SLS	engl. <i>static light scattering</i>
SPR	engl. <i>surface plasmon resonance</i>
t	Zeit
T18	T18-Fragmente der Adenylatzyklase von <i>B. pertussis</i>
T25	T25-Fragmente der Adenylatzyklase von <i>B. pertussis</i>
Tab.	Tabelle
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
Tet <sup>R</sup>	Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3indoxyl-β-D-galactopyranosid
ZM	Zytoplasmamembran
ZP	Zytoplasma

## Nomenklatur

Genprodukte werden so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtyp-Protein in der Aminosäuresequenz mit „1“ bezeichnet wird, unabhängig ob N-terminal entsprechende „Linker“ oder „Histidin-Tags“ vorausgehen.

Wenn von His<sub>10</sub>-CadC oder His<sub>6</sub>-CadC gesprochen wird, handelt es sich stets um das Wildtyp-Protein, das einen His<sub>10</sub>- bzw. einem His<sub>6</sub>-*Affinitätstag* besitzt. Hierbei ist immer das Protein mit einem N-terminalen Histidin-*Affinitätstag* gemeint, welcher über eine *linker* Sequenz von 9 Aminosäuren (SGHIEGRH) mit dem ersten Methionin im CadC-Protein verbunden ist.

Aminosäuren sind entweder im Einbuchstaben- (z. B. K) oder Dreibuchstaben- (z. B. Lys) Code angegeben. Spezifische Positionen in Proteinen werden als Zahlen hinter der jeweiligen Aminosäure angeführt (z. B. K95 oder Lys95).

Alle Nummerierungen beziehen sich auf die CadC-Sequenz von *Escherichia coli*. Die native Aminosäure wird bei Aminosäuresubstitutionen im Einbuchstabencode zuerst vor der entsprechenden Aminosäureposition genannt. Nach der Position wird die substituierte Aminosäure aufgeführt (z. B. R96A).

Es handelt es sich im Falle aller erwähnten Aminosäuren um L-Aminosäuren (z. B. L-Lysin).

Zur vereinfachten Nomenklatur im Zuge der BACTH-Studie sind die T18- und T25-Fragmente bei N-terminaler Fusion an das/die Protein/Chimäre vor dem/die entsprechenden Protein/Chimäre aufgeführt (z. B. T18-CadC). Sind T18 oder T25 am C-Terminus des/der Proteins/Chimäre fusioniert, so werden die Fragmente nach dem/der korrespondierenden Protein/Chimäre genannt (z. B. RpoA-T25).

## 1 Zusammenfassung

Das Einkomponentensystem CadC in *Escherichia coli* zählt zur Gruppe der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren und aktiviert bei niedrigem pH-Wert die Expression des *cadBA*-Operons, einem Säure-induzierbaren Lysin-Decarboxylase-System. Transkriptionsregulatoren der ToxR-Familie zeichnen sich durch einen gemeinsamen modularen Aufbau aus und bestehen aus einer periplasmatischen Sensordomäne, einer Transmembranhelix und einer zytoplasmatischen Effektordomäne. Die Signalwahrnehmung, -weiterleitung und -verarbeitung erfolgt bei den ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren innerhalb eines einzelnen Proteins. Die molekularen Mechanismen der Reizwahrnehmung durch CadC sind bekannt, die Signalweiterleitung und -verarbeitung im Zytoplasma sind hingegen weitgehend ungeklärt. In CadC ist ein zytoplasmatischer Linker (51 Aminosäuren) essentiell für die Signaltransduktion von der sensorischen Domäne zur DNA-Bindedomäne.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Signalweiterleitung von der sensorischen Domäne zur DNA-Bindedomäne untersucht. Mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Linkerregion unstrukturiert vorliegt. Im Rahmen einer umfangreichen Mutagenesestudie wurde beobachtet, dass sowohl eine Vielzahl an Aminosäuresubstitutionen (Veränderungen der Ladung, der Rigidität oder der Wahrscheinlichkeit zur Bildung einer  $\alpha$ -Helix) als auch die Verlängerung des CadC-Linkers zu keiner funktionellen Beeinträchtigung führte. Jedoch wurde die Signalverarbeitung im Zytoplasma durch Verkürzung des Linkers modifiziert und verursachte ein invertiertes Expressionsprofil des Zieloperons *cadBA* oder die Entkopplung der Expression vom externen pH. Der Linkerregion in CadC konnte keine Rolle in der Oligomerisierung zugeordnet werden. Unabhängig vom Linker wurde in einer in vivo Interaktionsstudie eine pH-abhängige Interaktion ( $\text{pH} < 6,8$ ) zwischen CadC-Monomeren gezeigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Röntgenkristallstruktur (2,0 Ångström) und in einem parallelen Ansatz die NMR-Struktur (0,46 backbone RMSD) der zytoplasmatischen Effektordomäne in CadC als erste dreidimensionale Struktur der DNA-Bindedomäne eines ToxR-ähnlichen Regulators aufgeklärt. In der Struktur von CadC<sub>1-107</sub> wurde ein „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv aus der Familie der OmpR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren beobachtet. Im Gegensatz zu der Topologie bereits gelöster OmpR-ähnlichen Regulatoren

enthält CadC am Übergang von DNA-Bindedomäne und Linkerregion einen zusätzlichen  $\beta$ -Strang ( $\beta$ -Strang 7), welcher sich stabilisierend auf die DNA-Bindung auswirken könnte.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der DNA-Bindemechanismus von CadC an den *cadBA*-Promotor untersucht. In in vitro Versuchen zur Bindung von löslichen CadC-Varianten an DNA konnte eine sehr geringe Dissoziationsrate beobachtet werden. Somit ist nicht die Affinität zur DNA sondern die Stimulus-abhängige Interaktion von CadC mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase essentiell für die Aktivierung des *cadBA*-Operons. Außerdem wurden, basierend auf der Kristallstruktur der DNA-Bindedomäne von CadC Aminosäuresubstitutionen durchgeführt. Die Aminosäure His66 in der Erkennungshelix  $\alpha 3$  ist an der Interaktion mit der großen Furche der DNA beteiligt, während die Aminosäuren Lys95 und Arg96 die Interaktion mit der kleinen Furche der DNA vermitteln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit postulieren ein Modell zur Signalverarbeitung in CadC, in welchem die Signalwahrnehmung im Periplasma zu konformationellen Veränderungen des unstrukturierten CadC-Linkers führt und somit die räumliche Positionierung der DNA-Bindedomänen im CadC-Dimer ermöglicht wird.

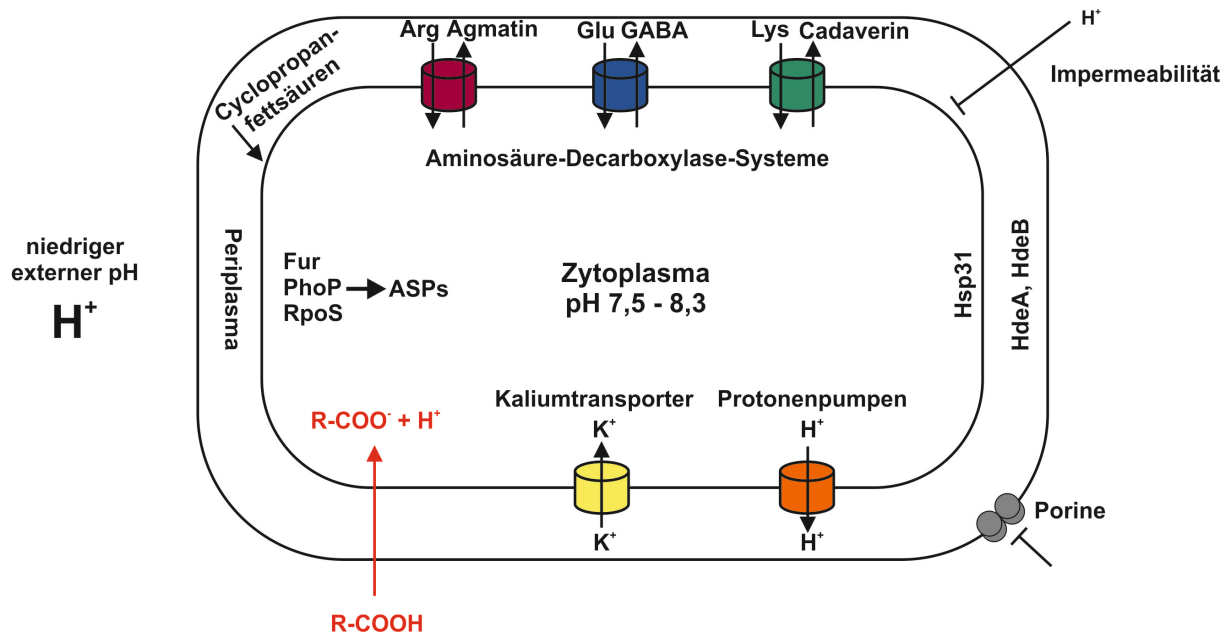
## 2 Einleitung

### 2.1 Säurestressadaption in *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ist ein Gram-negatives, peritrich begeißeltes Enterobakterium und wird zu der Gruppe der  $\gamma$ -Proteobakterien gezählt. Zu der Familie der Enterobakterien zählen neben harmlosen Kommensalen auch Pathogene, darunter Vertreter der Gattungen *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* und *Shigella*. Diese gehören zu den neutrophilen Mikroorganismen und bevorzugen Bedingungen eines neutralen pH-Wertes. Dennoch dient einem Großteil der Enterobakterien (enteron, griechisch für Darm) der Gastrointestinaltrakt von Menschen und warmblütigen Tieren als Habitat und Infektionsort. Bei der Besiedelung des Gastrointestinaltrakts müssen Bakterien wechselnde Stresssituationen bewältigen, besonders sind diese mit starken Schwankungen des pH-Wertes des umgebenden Milieus konfrontiert. Bei der Magenpassage sind die Zellen extrem sauren Bedingungen (pH 1,5-2,5) ausgesetzt, außerdem führen bakterielle Gärungsprozesse im Dünndarm zu der Produktion von schwachen organischen Säuren, wie Essigsäure und Propionsäure, die den Säurestress für die Zellen zusätzlich verstärken. Diese schwachen Säuren sind bei niedrigem pH-Werten protoniert und ungeladen und können so frei über die Zytoplasmamembran diffundieren und im neutralen Milieu des Zytoplasmas dissoziieren. Dies resultiert im Absinken des zytoplasmatischen internen pH-Wertes, in der Beeinträchtigung von Funktionalität und Stabilität von Makromolekülen und in der Zerstörung der protonenmotorischen Kraft (PMF, *Proton Motive Force*), da der pH-Gradient über die Zytoplasmamembran nicht aufrechterhalten werden kann. Die protonenmotorische Kraft wiederum wird für Energiegewinnung, Motilität und Transportprozesse der Zelle benötigt (Foster 2004). Daher ist eine rasche Anpassung an die ungünstigen Bedingungen eines niedrigen externen pH-Wertes eine essentielle Fähigkeit der Bakterien, um ihr Überleben zu sichern. Zur Aufrechterhaltung der pH-Homöostase haben Enterobakterien sowohl passive als auch aktive Anpassungsstrategien entwickelt (Abb. 1). Diese Anpassungsstrategien erlauben bei plötzlich wechselnden externen pH-Werten, das interne Milieu schnell auf neutrale pH-Werte einzustellen. Diese schnelle Reaktion deutet darauf hin, dass einige Komponenten der pH-Homöostase konstitutiv reguliert sind (Slonczewski *et al.* 1981). Wichtige passive Säureschutzmechanismen sind die Impermeabilität der Zytoplasmamembran gegenüber geladenen Molekülen und die Pufferkapazität des Zytoplasmas, wodurch ein Absinken des

internen pH-Wertes verhindert wird. Die Pufferkapazität des Zytoplasmas wird durch die Anwesenheit von Proteinen, Nukleinsäuren, Glutamat und Polyaminen gewährleistet (Slonczewski & Foster 1996). Die aktiven Säureschutzmechanismen können in physiologische, metabolische und Protonen-verbrauchende Systeme untergliedert werden. Als physiologische Anpassungsstrategie kann *E. coli* die Permeabilität der Membran für Protonen durch Aktivierung der Cyclopropan-Fettsäure-Phospholipid-Synthase CFA, welche die Bildung von Cyclopropanfettsäuren in der Zytoplasmamembran katalysiert, verringern (Brown *et al.* 1997). Durch die Bindung von Polyphosphat und Cadaverin an Porine (OmpC und OmpF) der äußeren Membran wird der Protoneneinstrom in die Zelle reduziert (Rowbury *et al.* 1992; Samartzidou *et al.* 2003). Außerdem schützen die Chaperone HdeA und HdeB Proteine des Periplasmas und das Chaperon Hsp31 Proteine des Zytoplasmas vor Degradation (Gajiwala & Burley 2000). Ein saures externes Milieu kann Transkriptionsregulatoren wie Fur und PhoP aktivieren, die zur Expression von etwa 50 Säure-Shock-Proteinen (ASP - *Acid Shock Proteins*) führen. Da Säure-Shock-Proteine der Reparatur und dem Schutz von Makromolekülen dienen, helfen diese in Säurestresssituationen zu überleben (Bearson *et al.* 1997). Die DNA wird durch Bindung des Proteins Dps vor den Auswirkungen eines niedrigen externen pH-Wertes geschützt. Als metabolische Anpassungsstrategie der Zelle wird bei moderatem Säurestress die Expression von Komponenten der Elektronentransportkette wie der NADH-Dehydrogenase I und II, der Cytochrom *bo* Oxidase und der Succinatdehydrogenase verstärkt (Maurer *et al.* 2005). Dies resultiert in einem Anstieg des intrazellulären pH-Wertes durch Erhöhung des Protonenexports. Außerdem werden bei der aktiven pH-Homöostase Protonen durch primäre Protonenpumpen unter Verbrauch von ATP aus der Zelle transportiert. Die Ausschleusung von Protonen führt zu einem Anstieg des Membranpotentials, wodurch ein weiterer Protonentransport verhindert wird. Zur Verringerung des Membranpotentials, werden gleichzeitig positive Ladungen mit Hilfe von K<sup>+</sup>-Transportsystemen, wie Trk und Kup, importiert (Bakker & Mangerich 1981). Um die Existenz von *E. coli* bei extrem sauren pH-Werten von 1-3 für ein begrenztes Zeitfenster von einigen Stunden zu sichern, wird die Expression von 160 Genen induziert. Dies bildet die Grundlage der Säureresistenz (AR, *Acid Resistance*) (Maurer *et al.* 2005; Richard & Foster 2004).





**Abb. 1: Säureadaptation in *E. coli*.** Um bei Bedingungen eines niedrigen externen pH-Wertes zu überleben, haben Enterobakterien verschiedene passive und aktive Strategien der pH-Homöostase entwickelt. Zu den passiven Mechanismen zählen die Pufferkapazität des Zytoplasmas und die Impermeabilität der Zytoplasmamembran für Protonen. Der Einbau von Cyclopropanfettsäuren in die Zytoplasmamembran, die Synthese von Säure-Schock-Proteinen (ASP, *Acid Shock Protein*), die Blockade von Porinen der äußeren Zellmembran, Protonenpumpen und Kaliumtransporter sowie der Schutz durch Chaperone (HdeA, HdeB und Hsp31) gehören zu den aktiven Mechanismen. Einen weiteren wichtigen aktiven Schutz vor den Auswirkungen eines niedrigen pH-Wertes bieten induzierbare Aminosäure-Decarboxylase-Systeme (Adi, Gad und Cad).

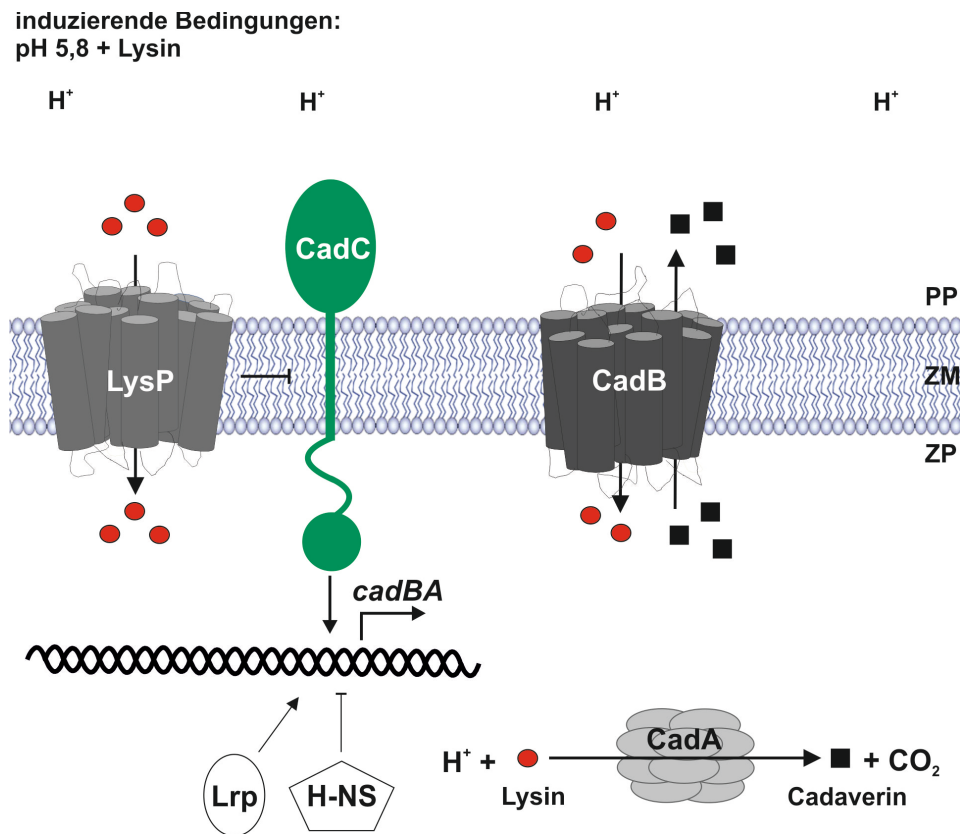
Insgesamt sind fünf Systeme der Säureresistenz zum Erhalt der pH-Homöostase in der stationären Wachstumsphase von *E. coli* bekannt, welche das Bakterium vor den Auswirkungen von niedrigen pH-Werten schützen. Das Glukose-reprimierende AR1-System (AR1, *Acid Resistance 1*), das auch als oxidatives System bekannt ist, ist abhängig von Sigmafaktor  $\sigma^S$ , kodiert durch *rpoS*, und von dem cAMP-Rezeptor-Protein CAP.  $\sigma^S$  und CAP regulieren die Expression von zahlreichen Säure-Schock-Proteinen (Castanie-Cornet *et al.* 1999). Bei den induzierbaren Säure-Toleranz-Antworten AR2 (AR2, *Acid Resistance 2*), AR3 (AR3, *Acid Resistance 3*) und AR4 (AR4, *Acid Resistance 4*) handelt es sich um degradative Aminosäure-Decarboxylase-Systeme. Das Gad-System (AR2), das Adi-System (AR3) und das Cad-System (AR4) katalysieren die Decarboxylierung der Aminosäuren Glutamat (Gad-System), Arginin (Adi-System) und Lysin (Cad-System) zu den Polyaminen  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Agmatin und Cadaverin unter Freisetzung von  $CO_2$ . Außerdem wird bei

der Decarboxylierung ein internes Proton verbraucht; dies führt zu einem Anstieg des intrazellulären pH-Werts (Gale & Epps 1942). Die entsprechenden Polyamine werden aus der Zelle transportiert und alkalisieren das umgebene Medium. In einigen *E. coli*-Stämmen existiert ein weiteres Säureschutzsystem (AR5, *Acid Resistance* 5) bestehend aus der Ornithin-Decarboxylase SpeF und dem Ornithin-Putrescin-Antiporter PotE (Kashiwagi *et al.* 1991). Die Systeme AR1, AR2 und AR3 schützen *E. coli* unter extremen und wachstumshemmenden Säurestress (pH-Werte 1-3), während die Systeme AR4 und AR5 eher in die Existenzsicherung bei moderatem Säurestress (pH-Werte 5-7) involviert sind (Applebaum *et al.* 1977; Sabo *et al.* 1974).

## 2.2 Das Cad-System in *E. coli*

Das Lysin-abhängige Decarboxylase-System AR4, das Cad-System, setzt sich aus der zytoplasmatischen Lysin-Decarboxylase CadA, dem Membran-integralen Lysin-Cadaverin Antiporter CadB und dem ebenfalls Membran-integralen Regulator CadC (Meng & Bennett 1992; Sabo *et al.* 1974) zusammen. Das Cad-System in *E. coli* bietet moderaten Schutz bei Bedingungen eines extremen Säurestress (pH ~2), spielt jedoch eine wichtige Rolle im Schutz der Zellen bei weniger extremen pH-Werten (pH ~5) (Iyer *et al.* 2003). Auch ist das Cad-System bei Nährstoff-limitierenden Bedingungen (z. B. Phosphatmangel) von Bedeutung (Moreau 2007). CadB und CadA sind gemeinsam in dem *cadBA*-Operon (Lokalisation im Chromosom: 93,5 min) kodiert, welches unter Kontrolle des *cadBA*-Promotors ( $P_{cadBA}$ ) liegt (Auger & Bennett 1989). Die *cadBA*-Expression wird durch einen niedrigen externen pH-Wert und der extrazellulären Verfügbarkeit von Lysin co-induziert (Dell *et al.* 1994). Die Aktivierung des *cadBA*-Operons erfolgt durch den Transkriptionsregulator CadC, welcher konstitutiv durch das unmittelbar stromaufwärts von *cadBA* liegende Gen *cadC* kodiert wird (Watson *et al.* 1992). Die Lysin-Decarboxylase CadA katalysiert die Decarboxylierung von Lysin zu Cadaverin und CO<sub>2</sub> unter Verbrauch eines zytoplasmatischen Protons. Die relative Molekülgröße von CadA beträgt 81 kDa (715 Aminosäuren). CadA liegt im aktiven Zustand als Dekamer vor, bestehend aus fünf Dimeren. Interaktion des CadA-Dekamers mit zehn Molekülen des Effektorproteins ppGpp blockiert die Decarboxylase-Aktivität von CadA. Sind die Zellen Säurestress unter Bedingungen einer Nährstofflimitation ausgesetzt, werden Aminosäure-Decarboxylase-Systeme zum Überleben bei niedrigen pH-Werten benötigt. Gleichzeitig müssen die Zellen bei Nährstofflimitation den Verbrauch von Aminosäuren durch die Decarboxylase-Systeme gering halten und die enzymatische Decarboxylase-

Aktivität nach Erreichen eines neutralen internen pH-Wertes rasch reduzieren. Durch Interaktion mit ppGpp kann eine Feinabstimmung der bakteriellen Säurestressantwort erfolgen (Kanjee *et al.* 2011). Cadaverin, das entstandene Endprodukt der Lysin-Decarboxylierung, wird durch den Lysin-Cadaverin Antiporter CadB in das Periplasma transportiert. Gleichzeitig wird Lysin durch CadB ins Zytoplasma befördert (Soksawatmaekhin *et al.* 2004). Das exportierte Cadaverin und das bei der Reaktion verbrauchte Proton führen zu einer Neutralisierung des umgebenden Mediums. Die relative Molekülmasse von CadB beträgt 47 kDa (444 Aminosäuren), außerdem zeigt CadB Ähnlichkeit mit dem Ornithin-Putrescin-Antiporter PotE des AR5-Systems (Tomitori *et al.* 2012).



**Abb. 2: Das Cad-System in *E. coli*.** Bei niedrigem externen pH (pH 5,8) und Vorhandensein von Lysin aktiviert der Membran-integrale Transkriptionsregulator CadC die Transkription des *cadBA*-Operons. CadA, eine Lysin-Decarboxylase, decarboxyliert Lysin unter Verbrauch eines Protons zu Cadaverin und  $CO_2$ . Cadaverin wird über den Lysin/Cadaverin Antiporter CadB aus der Zelle exportiert. Die Transkription des *cadBA*-Operons wird unter nicht induzierenden Bedingungen (neutraler externer pH-Wert, Abwesenheit von Lysin) durch die Lysinpermease LysP und den globalen Regulator H-NS reprimiert. Der Regulator Lrp dient der positiven Regulation der *cadBA*-Expression. PP: Periplasma; ZM: Zytoplasmamembran; ZP: Zytoplasma

## 2.3 Die Regulation des Cad-Systems

Die Regulation des Cad-Systems in *E. coli* unterliegt diversen Proteinen und extrazellulären Signalen. Die Aktivierung der *cadBA*-Transkription erfolgt durch direkte Bindung des Transkriptionsregulators CadC an die *cadBA*-Promotorregion (Küper & Jung 2006). Der Transkriptionsregulator CadC steht unter der Kontrolle des *cadC*-Promotors und wird konstitutiv exprimiert (Neely & Olson 1996). Unter neutralen und aeroben Bedingungen reprimiert der globale Regulator H-NS (Histon-ähnliches Nukleoid Strukturierendes Protein) die Transkription des *cadBA*-Operons (Shi *et al.* 1993) und von *cadC* (Krin *et al.* 2010). Die relative Molekülgröße von H-NS beträgt 15,5 kDa (137 Aminosäuren). H-NS bindet bevorzugt an AT-reiche und intrinsisch gekrümmte Bereiche der DNA. Für *cadBA* konnten fünf potentielle H-NS Bindestellen identifiziert werden. Die Bindung von H-NS an die Promotorregionen generiert vermutlich einer Superspiralisierung der DNA, wodurch die Transkription reprimiert wird (Küper & Jung 2006). Da die Bindung von H-NS von der Topologie der DNA abhängig ist, können Änderungen der DNA-Topologie unter anaeroben Bedingungen zu einer schwächeren Bindung von H-NS führen und dadurch eine verstärkte *cadBA*-Expression erlauben (Küper 2005). In Abwesenheit von Lysin wird der Transkriptionsregulator CadC durch die Lysinpermease LysP gehemmt (Rauschmeier *et al.* 2014). LysP hat eine relative Molekülgröße von 54 kDa (489 Aminosäuren) und ist mit 12 Transmembrandomänen in der Zytoplasmamembran verankert (Steffes *et al.* 1992). In Abwesenheit des Lysin- und des pH-Stimulus geht LysP eine stabile heterooligomere Interaktion mit CadC ein. Diese Interaktion wird auf Seiten des Sensors CadC über aromatische Aminosäuren in der Transmembrandomäne (besonderes F165) und über geladene Reste der periplasmatischen Domäne (R265 und R268) vermittelt. Das Lysinsignal wird von LysP sensiert, anschließend wird das Signal über Lysin-abhängige Konformationsänderungen zu CadC transferiert (Rauschmeier *et al.* 2014; Tetsch *et al.* 2008). Die Endprodukte Cadaverin und CO<sub>2</sub> der Decarboxylase-Reaktion durch CadA haben einen zusätzlichen reprimierenden Einfluss auf die Expression des Cad-Systems (Neely & Olson 1996; Takayama *et al.* 1994). Der molekulare Mechanismus der Repression der *cadBA*-Expression durch CO<sub>2</sub> ist bisher noch nicht verstanden. Cadaverin agiert als negativer Rückkoppler für den Sensor CadC, indem Cadaverin direkt an die periplasmatische Domäne von CadC bindet. In CadC wurden zwei periplasmatische Cadaverin-Bindestellen identifiziert, eine hochaffine Bindetasche an der Grenzfläche von CadC-Dimeren und eine weitere exponierte Bindestelle in der zentralen Kavität der periplasmatischen Domäne (Haneburger *et al.* 2012). Als

positiver Regulator der *cadBA*-Expression wurde Lrp (*Leucine-Responsive Protein*) detektiert, welches die *cadBA*-Expression erhöht und an den physiologischen Status der Zelle anpasst (Ruiz *et al.* 2011). EF-P (*elongation factor P*) wurde als weiteres Protein, das an der translationellen Regulation des Cad-Systems beteiligt ist, identifiziert. Bei EF-P handelt es sich um ein 20,5 kDa (187 Aminosäuren) großes, lösliches Protein, welches in allen Bakterien hoch konserviert vorliegt (Aoki *et al.* 1991). EF-P interagiert neben den Proteinen EF-Tu und EF-G direkt mit den Ribosomen (Glick & Ganoza 1975) und es wurde gezeigt, dass EF-P die Translation von Proteinen mit Polyprolin-haltigen Regionen verbessert (Ude *et al.* 2013). Prolin enthält als einzige Aminosäure anstelle der primären Aminogruppe eine Iminogruppe und ist daher sowohl ein schwacher Akzeptor als auch ein schwacher Donor für Peptidbindungen. Dies resultiert in der Arretierung des Ribosoms an Stellen, an denen mehrere Proline verknüpft werden sollen. In Gegenwart von EF-P kann diese translationelle Blockade gemildert werden. Eine weitere Funktion von EF-P liegt in der Regulation der Feinabstimmung der Kopienzahl des Polyprolin-haltigen Regulators CadC. Diese physiologische Funktion von EF-P ist essentiell für eine adäquate Stressantwort (Ude *et al.* 2013).

## 2.4 Der Transkriptionsaktivator CadC

Der Regulator des *cadBA*-Operons, CadC, besteht aus 512 Aminosäuren mit einem relativen Molekulargewicht von 58 kDa. CadC gehört zur Klasse der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren, die anhand ihrer ähnlichen Topologie charakterisiert sind und meist bei niedrigen pH-Werten aktiviert werden (Miller *et al.* 1987). Zu dieser Familie zählen der Masterregulator ToxR aus *Vibrio cholerae* (und aus anderen *Vibrio*-Spezies) (Miller *et al.* 1987), PsaE aus *Yersinia pseudotuberculosis* (Yang & Isberg 1997), WmpR aus *Pseudoalteromonas tunicata* (Egan *et al.* 2002), TcpP aus *Vibrio cholerae* (Häse & Mekalanos 1998) und neben CadC aus *Escherichia coli* auch CadC-Proteine aus *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* (Merrell & Camilli 2000) und *Vibrio vulnificus* (Rhee *et al.* 2002). ToxR ist essentiell für die Koordination der Expression von Virulenz-assoziierten Genen in *V. cholerae*, die in die Kontrolle des Cholera-toxins, der Pilusformation und die Expression von Proteinen der äußeren Membran involviert sind (Miller *et al.* 1987). ToxR dimerisiert unter induzierenden Bedingungen und nicht induzierenden Bedingungen in vivo und in vitro (Ottemann & Mekalanos 1995), allerdings konnte der Mechanismus der Signaltransduktion nicht in Korrelation zu dem Mechanismus der Dimerisierung gebracht

werden (Dziejman *et al.* 1999). Da ToxR der Masterregulator der Pathogenität von *V. cholerae* darstellt, liegt der Schlüssel zum Verständnis der durch *V. cholerae* verursachten Krankheit Cholera in der Regulation dieses Aktivators. Es konnte gezeigt werden, dass die Virulenzkaskade in *V. cholerae* die Rekrutierung von TcpP durch ToxR zu dem *toxT*-Promotor zur Aktivierung der Transkription involviert. Die Mechanismen dieser Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen bleiben jedoch unverstanden (Haas *et al.* 2014). Proteine aus der Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren sind aus einer N-terminalen, zytoplasmatischen Domäne (CadC: Aminosäure 1-158), einer einzelnen Transmembranhelix (CadC: Aminosäure 159-178) und einer C-terminalen, periplasmatischen Signaleingangsdomäne (CadC: Aminosäure 179-512) aufgebaut (Watson *et al.* 1992). Die ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren vereinen die Funktionen der Signalwahrnehmung, -weiterleitung und -verarbeitung in einem einzelnen Protein und stellen somit die einfachste Form der Signaltransduktion dar, das Einkomponentensystem. Im Einkomponentensystem CadC findet die Signalweiterleitung im Gegensatz zu den klassischen Zweikomponentensystemen ohne chemische Modifikation statt. Einkomponentensysteme sind evolutionär älter, diverser und häufiger unter Prokaryoten vertreten als Zweikomponentensysteme (Ulrich *et al.* 2005). Sowohl ToxR und TcpP aus *V. cholerae*, PsaE aus *Y. pseudotuberculosis* und CadC aus *E. coli* sensieren einen niedrigen externen pH-Wert im Periplasma und transferieren das Signal über die Transmembrandomäne zur zytoplasmatischen Domäne. Für CadC in *E. coli* konnte neben der Detektion eines niedrigen externen pH-Wertes auch die Wahrnehmung von externem Cadaverin über die periplasmatische Domäne nachgewiesen werden (Haneburger *et al.* 2012). Die Wahrnehmung des Transkriptions-aktivierenden niedrigen pH-Werts erfolgt über die C-terminale Domäne im Periplasma. Die Struktur der periplasmatischen Domäne von CadC konnte mittels multipler anomaler Dispersion (MAD) mit einer Auflösung von 1,8 Å gelöst werden (Eichinger *et al.* 2011). Die periplasmatische Domäne von CadC besteht aus zwei Subdomänen. Subdomäne eins ist aus einer Mischung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, während Subdomäne zwei aus einem reinen  $\alpha$ -Helix-Bündel besteht (Abb. 3). Die Stimulus-detektierende Funktion der periplasmatischen Domäne von CadC konnte anhand verschiedener Aminosäureaustausche identifiziert werden (Dell *et al.* 1994). Weitere CadC-Varianten mit Aminosäureaustauschen in der periplasmatischen Domäne konnten den für die pH-Sensorik essentiellen Bereich auf eine negativ geladene Region (D198, D200, E461, E468 und D471) an der Grenzfläche zwischen zwei Monomeren zuordnen (Haneburger *et al.* 2011). In Lösung konnte für die periplasmatische Domäne von CadC die Bildung von Homodimeren über eine

polare Grenzfläche zwischen zwei Monomeren beobachtet werden. Des Weiteren ist die Dimerisierung der periplasmatischen Domäne von CadC für die Aktivierung des *cadBA*-Operons notwendig (Eichinger *et al.* 2011; Haneburger *et al.* 2011; Lindner & White 2014).



**Abb. 3: Die Kristallstruktur der periplasmatischen Domäne von CadC.** Die Kristallstruktur der periplasmatischen Domäne von CadC ist mit einer Auflösung von 1,8 Ångström gelöst. Sie besteht aus zwei Subdomänen. Subdomäne eins ist aus einer Mischung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, während Subdomäne zwei aus einem reinen  $\alpha$ -Helix-Bündel besteht. Der C-Terminus (C) und der N-Terminus (N) sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm Pymol (DeLano 2002) erstellt.

Es wird postuliert, dass die Protonierung der negativ geladenen Aminosäuren die abstoßenden Kräfte zwischen zwei Subdomänen und/oder zwischen zwei Monomeren im CadC-Dimer reduziert und somit die Aktivierung des *cadBA*-Operons bei niedrigen externen pH-Werten ermöglicht wird (Eichinger *et al.* 2011). Auch konnte der Formierung eine Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne eine Rolle für die pH-abhängige Aktivierung der *cadBA*-Expression zugeordnet werden. Unter neutralen externen Bedingungen führt die Bildung der Disulfidbrücke zu einer Inaktivierung von CadC, bei niedrigen externen pH-Werten wird die Bildung der Disulfidbrücke verhindert und CadC befindet sich in semi-aktiven Zustand. Der Transmembrandomäne in CadC konnte neben der Funktion der Membranverankerung eine Rolle in der Interaktion mit der Lysinpermease LysP zugeordnet werden (Rauschmeier *et al.* 2014). Erst nach Perzeption des Lysin-Stimulus durch LysP aktiviert CadC die *cadBA*-Expression (Tetsch *et al.* 2011). Die Reihenfolge der Wahrnehmung der Stimuli Lysin und pH

ist für die Aktivierung durch CadC nicht relevant (Neely & Olson 1996). Die Bindung an den *cadBA*-Promotor erfolgt mittels eines „winged Helix-Turn-Helix“ Motivs der zytoplasmatischen Effektdomäne von CadC, wie es Transkriptionsregulatoren der RO<sub>II</sub>-Familie besitzen. Zu dieser Familie zählen neben CadC, PhoB und OmpR aus *E. coli* auch VirG aus *Agrobacterium tumefaciens* (Martinez-Hackert & Stock 1997; Parkinson & Kofoid 1992; Watson *et al.* 1992). Neben der hochkonservierten DNA-bindenden Domäne besteht die zytoplasmatische Domäne der ToxR-ähnlichen Regulatoren aus einer Linkerregion (Aminosäure 107-158), welche die DNA-bindende Domäne mit der Transmembrandomäne verbindet. Bisher konnte dieser zytoplasmatischen Region in CadC keine Funktion zugeordnet werden. Über den Mechanismus der Signaltransduktion von der periplasmatischen Sensordomäne zur zytoplasmatischen Effektdomäne in CadC kann zum derzeitigen Stand der Forschung nur spekuliert werden. Es werden sowohl reversible Konformationsänderungen wie Dreh- und synchrone oder unsynchrone Hubbewegungen als auch reversible Monomer-Dimer-Übergänge des Transkriptionsaktivators CadC diskutiert (Haneburger *et al.* 2011). CadC induziert die Aktivierung der *cadBA*-Expression über die direkte Bindung an die beiden stromaufwärts des *cadBA*-Promotorbereichs gelegenen Bindestellen Cad1 (-144 bp bis -112 bp vor dem Transkriptionsstart) und Cad2 (-89 bis -59 bp vor dem Transkriptionsstart) (Küper & Jung 2006). Die Aktivierung der *cadBA*-Transkription ohne proteolytische Abspaltung durch den Membran-integralen Transkriptionsaktivator CadC stellt einen seltenen Mechanismus der Transkriptionsaktivierung in Prokaryoten dar (Haas *et al.* 2014). Auch die in die Membran verankerten Regulatoren ToxR aus *V. cholerae* und ArnR aus Archaeen aktivieren die Transkription ohne vorhergehende proteolytische Abspaltung (Haas *et al.* 2014; Kolibachuk & Greenberg 1993; Lassak *et al.* 2013). Für die Bindung von ToxR an die DNA konnte ein „Tandem-Repeat“-Motiv von 7 bp (TTTTGAT) innerhalb des *toxT*-Promotors identifiziert werden (Miller *et al.* 1987). Allerdings variieren die Strukturen der Promotorregionen innerhalb der Familie der ToxR-ähnlichen Regulatoren stark und ein einheitliches Bindemotiv ist nicht bekannt. Selbst ToxR reguliert eine Vielzahl verschiedener Gene (Haas *et al.* 2014), wodurch die Analyse des Aktivierungsmechanismus erschwert wird. So kann ToxR als Repressor des *ompT*-Gens dienen. Dabei bindet ToxR an eine Bindestelle, die mit dem *ompT*-Promotor überlappt und die Interaktion mit der RNA-Polymerase (RNAP) verhindert (Li *et al.* 2002).



## 2.5 Signalweiterleitende Proteindomänen

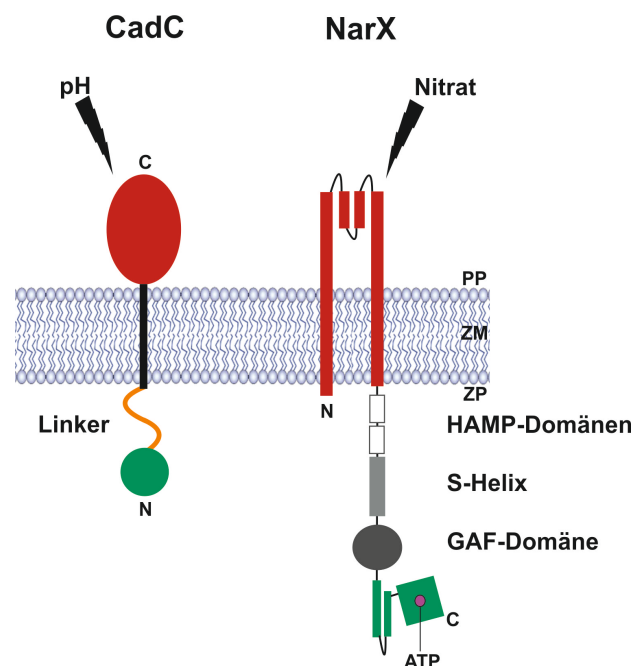
Für Prokaryoten ist es essentiell externe Umweltreize wahrzunehmen und sich an wechselnde Bedingungen anzupassen. Daher exprimieren diese eine Vielzahl an sensierenden und Signalverarbeitenden Proteinen (Henry & Crosson 2011). Die Relevanz und Funktion von diversen Domänenstrukturen dieser Proteine wurde in den vergangenen Jahren versucht aufzuklären. So konnte experimentell bestätigt werden, dass einzelne Proteindomänen in Ein- und Zweikomponentensystemen ohne Verlust von Funktionalität ausgetauscht werden konnten (Kanchan *et al.* 2010; Mondéjar *et al.* 2012). Viele dieser Domänen spielen eine entscheidende Rolle in der Signalwahrnehmung, doch wird ihnen oftmals auch eine Bedeutung in der Signaltransduktion zugeschrieben (Henry & Crosson 2011).

Sowohl Bakterien als auch Eukaryoten und Archaeen weisen oftmals PAS-Domänen (Akronym aus den Proteinnamen Per-Arnst-Sim) auf (Zhulin *et al.* 1997). PAS-Domänen repräsentieren eine große, ubiquitär verbreitete Familie und fungieren als direkter Sensor von externen Reizen (Taylor & Zhulin 1999), vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Lee *et al.* 2008) und sind in die Signaltransduktion involviert (Oka *et al.* 2008). Diese bestehen aus etwa 100 Aminosäuren und sind meist am N-Terminus von Proteinen, wie Histidinkinasen (HK), c-di-GMP-Synthasen (GGDEF) und Chemotaxis-Proteinen lokalisiert. Interessanterweise teilen PAS-Domänen weniger als 20% Sequenzidentität, jedoch weisen sie eine konservierte dreidimensionale Faltungsstruktur auf (Henry & Crosson 2011). Die Bindung diverser kleiner Moleküle (u.a. Flavin-Adenin-Dinukleotid, Häm oder 4-Hydroxycinnamyl) dient als Cofaktor und vermittelt die Wahrnehmung von externen Umweltreizen wie molekularer Sauerstoff (Tuckerman *et al.* 2009), Licht (Swartz *et al.* 2007) und Redoxpotential (Ukaegbu *et al.* 2006). Da jedoch nicht alle PAS-Domänen kleine Moleküle binden, sind die unterschiedlichen Mechanismen der Signalwahrnehmung bisher nicht verstanden.

Eine ähnliche Faltungsstruktur wie PAS-Domänen weisen GAF-Domänen (Akronym aus cGMP-spezifische Phosphodiesterase, Adenylylcyclase und FhlA) auf. Wie PAS-Domänen sind auch cGMP-bindende GAF-Domänen ubiquitär in einer Vielzahl von Proteinen, die in die Wahrnehmung und Weiterleitung von Signalen involviert sind, vertreten. Die strukturelle Ähnlichkeit der GAF- und PAS-Domänen deutet auf eine evolutionäre Verwandtschaft hin (Ho *et al.* 2000).

Eine weitere signalverarbeitende Proteindomäne ist die HAMP-Domäne (Akronym aus Histidinkinase, Adenylatcyclase, Methyl-akzeptierendes Protein und Phosphatase), bei dieser handelt es sich um eine der am weitest verbreiteten Domänen. HAMP-Domänen bestehen aus

etwa 55 Aminosäuren und sind in die Signaltransduktion von zahlreichen Proteinen aus allen drei Bereichen des Lebens involviert (Aravind & Ponting 1999). Strukturanalysen von HAMP-Domänen zeigen vier dimere, parallele und  $\alpha$ -helikale Schrauben, welche zwischen der Signaleingangsdomäne und der Signalausgangsdomäne lokalisiert sind (Hulko *et al.* 2006). Typischerweise enthalten HAMP-Motive charakteristische, hydrophobe und heptade Wiederholungen und liegen in Membran-integralen Proteinen zytoplasmatisch vor (Aravind & Ponting 1999). Momentan werden verschiedene molekulare Mechanismen der Signalübertragung in HAMP-Domänen diskutiert. Signalübertragung könnte durch eine axiale Rotationsbewegung der  $\alpha$ -helikalen Schrauben („Gearbox“-Modell) (Hulko *et al.* 2006), einer Neuordnung der  $\alpha$ -Helices („Rearrangement“-Modell) (Airola *et al.* 2010) oder als dynamisches, biphasisches Ereignis („Three-State Biphasic Dynamic Bundle“-Modell) (Stewart 2014) erfolgen.



**Abb. 4. Vergleich des modularen Aufbaus von CadC und NarX aus *E. coli*.** Signaleingangsdomänen sind in rot dargestellt, Signalausgangsdomänen in grün. CadC besteht aus einer pH-sensiblen periplasmatischen Domäne (rot), einer Transmembrandomäne (schwarz), einer Linkerregion (orange) und einer DNA-Bindedomäne (grün). NarX ist aus Nitrat-sensiblen periplasmatischen Domäne (rot), zwei HAMP-Domänen (weiß), einer S-Helix (grau), einer GAF-Domäne (dunkelgrau) und ATP-bindender Effektor-domäne (hellgrün) aufgebaut. Der C-Terminus (C) und der N-Terminus (N) sind gekennzeichnet.

Da der Nitratsensor NarX aus *E. coli* verschiedene Proteindomänen aufweist wurde der modulare Aufbau von NarX mit dem modularen Aufbau von CadC verglichen. In NarX wird die GAF-Domäne mit der HAMP-Domäne über eine direkt an die HAMP-Domäne anschließende und teilweise überlappende S-Helix („*Signaling-Helix*“) verbunden (Abb. 4). Bei der S-Helix handelt es sich um ein etwa 40 Aminosäuren großes Segment, welches in einer Vielzahl von Sensorproteinen in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeen vertreten ist. Sie verbindet Signaleingangs- mit Signalausgangsdomänen und liegt als dimere und parallele  $\alpha$ -helikale Schraube vor (Winkler *et al.* 2012). Eine signalübertragende Rolle der S-Helix konnte mit Hilfe von Deletionsstudien in NarX verifiziert werden. So führten Deletionen der heptaden Wiederholungen zu konstitutiv aktiven Phänotypen (Stewart & Chen 2010). CadC umfasst weniger Proteindomänen als NarX. Die zytoplasmatische Domäne in CadC besteht aus der DNA-Bindedomäne die durch eine unstrukturierte Linkerregion mit der Transmembranhelix verbunden ist. In CadC übernimmt die Linkerregion die Signaltransduktion im Zytoplasma, in NarX wird diese Rolle von diversen Proteindomänen (HAMP-Domänen, S-Helix und GAF-Domäne) übernommen.

In der Proteinstrukturbiologie wurde bisher angenommen, dass der dreidimensionale Faltungszustand essentiell für die Funktionalität eines Proteins ist (Uversky & Dunker 2008). Jedoch wurden funktionale Proteine mit großen unstrukturierten Regionen entdeckt, so enthalten etwa 20% der Proteine in *E. coli* K-12 unstrukturierte Segmente von mehr als 30 Aminosäuren (Tompa *et al.* 2006). Unstrukturierte Proteine sind in die Signaltransduktion, in die Regulation des Zellzyklus und in die Interaktion mit Bindepartnern involviert (Uversky & Dunker 2008). Oftmals dienen unstrukturierte Linkerregionen auch als Verbindungselement oder Abstandhalter zwischen strukturierten Proteindomänen und ermöglichen deren freie Orientierung und Rotation im Raum (Liu & Huang 2014). Ein Beispiel eines Linkers ist die unstrukturierte Region in *E. coli* FtsZ (*Filamentous Temperature-Sensitive Z*). Substitutionen des FtsZ-Linkers führten in *in vivo* Experimenten zu keinen funktionellen Beeinträchtigungen. Es wurde infolgedessen angenommen, dass die Aminosäuresequenz keine Relevanz für die Funktionalität des Proteins hatte. Vielmehr sollte die unstrukturierte Region als flexibler Linker zwischen der globulären Domäne und der Transmembrandomäne dienen (Gardner *et al.* 2013). Auch in CadC wird die Transmembrandomäne mit der DNA-bindenden Effektdomäne mittels einer Linkerregion verbunden (Abb. 4). Anders als für die starre  $\alpha$ -helikale S-Helix in NarX könnte diese Linkerregion Flexibilität und Beweglichkeit der zytoplasmatischen Domäne ermöglichen.

### 3 Aufgabenstellung

Bei dem ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulator CadC handelt es sich um ein sogenanntes Einkomponentensystem. Dabei werden Signalwahrnehmung, -weiterleitung und -verarbeitung in einem Protein vereint. Stimuliert durch Säurestress aktiviert CadC die Expression des *cadBA*-Operons. Während der Mechanismus der Reizwahrnehmung gut untersucht ist, sind Signalverarbeitung und Signalweiterleitung bisher kaum verstanden. Daher fokussiert diese Arbeit auf die Charakterisierung der Mechanismen der molekularen Signalübertragung in CadC unter folgenden Aspekten:

1. Charakterisierung einer zytoplasmatischen Region unbekannter Funktion zwischen DNA-bindender Domäne und Transmembrandomäne und *Screening* nach Aminosäureresten, die essentiell für die zytoplasmatische Signalweiterleitung in CadC sind
2. Strukturanalyse der DNA-bindenden Domäne von CadC als Beispiel der ToxR-ähnlichen Transkriptionsaktivatoren mittels Kernspinresonanzspektroskopie und Röntgenkristallographie sowie Untersuchung der Dynamik der zytoplasmatischen Region unbekannter Funktion mittels Kernspinresonanzspektroskopie in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Sattler und Dr. Andreas Schlundt (Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie, Technische Universität München)
3. Aufklärung des DNA-Bindemechanismus von CadC an den *cadBA*-Promotor mittels Kernspinresonanzspektroskopie, Gel-Retardationsexperimenten und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie *in vitro* und mittels gerichteter Mutagenese des „winged Helix-Turn-Helix“ DNA-Bindemotivs *in vivo*

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab. 1 Verwendete Materialien**

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl Phosphat (BCIP)	AppliChem (Darmstadt)
Acrylamid	National Diagnostics (Atlanta, USA)
Agarose	Serva (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase konjugierter Anti-Maus IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
Amidoblack 10 B	Roth (Karlsruhe)
Ammonium- <sup>15</sup> N-chlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth (Karlsruhe)
L(+)-Arabinose	Roth (Karlsruhe)
BioBeads	BioRad (München)
Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt)
Brilliant Blau G250	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England Biolabs (Frankfurt)
Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonuklease I (DNase)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen (Karlsruhe)
N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid, (LDAO)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Disuccinimidylsuberat (DSS)	Pierce (Rockford)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
DNA-Standard (2-Log DNA-Ladder)	New England Biolabs (Frankfurt)
DNeasy 96 Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
HiYield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit	SLG-Süd-Laborbedarf (Gauting)
HiYield Plasmid-Mini-Kit	SLG-Süd-Laborbedarf (Gauting)
Imidazol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	PeqLab (Erlangen)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)
Lipide ( <i>E. coli</i> )	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
L-Lysin Hydrochlorid	Sigma (Deisenhofen)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose	Quiagen (Hilden)
Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT)	Biomol (Hamburg)
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare (Braunschweig)

Oligonukleotide	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (oNPG)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Penta-His-IgG	Qiagen (Hilden)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Quick & Easy <i>E. coli</i> Gene Deletion Kit	Gene Bridges (Heidelberg)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt)
RNA-Polymerase Holoenzym <i>E. coli</i>	Affymetrix (Ohio, USA)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
Taq DNA-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)	Sigma (Deisenhofen)
Triton X-100	Calbiochem (LaJolla, Kalifornien)
Tween 20	GE Healthcare (Braunschweig)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Alltech Grom GmbH (Rottenburg-Hailfingen), Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

## 4.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2, die Plasmide in Tabelle 3 und die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tab. 2** Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
MG1655	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>ilvG rfb50 rph-1</i>	(Blattner <i>et al.</i> 1997)
MG1655Δ <i>lacZ</i>	MG1655 <i>lacZ::tet</i>	Jahreis (persönl. Gabe)
MG1655Δ <i>lacZ</i> - Δ <i>cadC</i>	MG1655 <i>cadC::Kan</i> [MG1655 X P1 (W3110- Δ <i>cadC</i> )]	(Küper 2005)
EP314	F <sup>-</sup> IN( <i>rmD-rmE</i> ) Δ( <i>lacIOPZYA</i> ) <i>exa-1::MuDI1734 (Km lac)<sup>a</sup> cadC1::Tn10</i>	(Neely <i>et al.</i> 1994)
DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), λ<sup>-</sup></i>	(Meselson & Yuan 1968)
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)/F [traD36 proAB* lac<sup>f</sup>lacZΔM15]</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> dcm gal</i> (DE3) pLysS (Cm <sup>R</sup> ) <i>tonA</i>	(Studier & Moffatt 1986)
BL21(DE3)Δ <i>cadC</i>	BL21(DE3) <i>cadC::cat</i> (Cm <sup>R</sup> )	(Rauschmeier 2014)

MC4100	F- <i>araD139 (argF-lac)U169 rpsL150 relA flb-5301 ptsF25 deoC1</i>	(Casadaban 1976)
MC4100Δtig	MC4100 <i>tig::npt</i>	Bukau (persönl. Gabe)
BTH101	F <sup>-</sup> <i>cyaA-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1 hsdR2 μrA1 μrB1</i>	(Karimova <i>et al.</i> 1998)
BW25113	Δ( <i>araD-araB</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i> ), λ <sup>mda</sup> , <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR</i> 514	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW4094	BW25113 <i>cadC::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW1225	BW25113 <i>hns::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW1328	BW25113 <i>fnr::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW2115	BW25113 <i>mlrA::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW0075	BW25113 <i>leuO::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW0026	BW25113 <i>fkpB::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW0514	BW25113 <i>ppiB::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW3748	BW25113 <i>ppiC::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW3311	BW25113 <i>slyD::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
JW2293	BW25113 <i>ackA::npt</i>	(Baba <i>et al.</i> 2006)
DC1185	Δ( <i>pta ackA</i> )201 <i>zfa::Tn10</i>	(Chang <i>et al.</i> 1994)
LF1	MG1655 <i>rpsL150 P<sub>lac</sub>::rpsL-neo-kan::lacZ<sup>Δ1-100</sup><sub>bp</sub></i> , <i>Kan<sup>R</sup> Strp<sup>S</sup></i>	(Fried <i>et al.</i> 2012)
LF1_ <i>cadC</i> _Ins	MG1655 <i>rpsL150 P<sub>cadC</sub>-cadC::lac</i> , Δ <i>cadC</i> , <i>Kan<sup>R</sup>, Strp<sup>S</sup></i>	diese Arbeit
LF1_ <i>2cadC</i>	MG1655 <i>rpsL150 P<sub>cadC</sub>-cadC::lacZ</i> , <i>Kan<sup>S</sup>, Strp<sup>R</sup></i>	diese Arbeit

Tab. 3 Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Herkunft
<b>Allgemein verwendete Plasmide</b>			
pET16b	Amp <sup>R</sup>	Klonierungs- und Expressionsvektor	Novagen
pET16b-cadC	Amp <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>.cadC</i> in pET16b	(Küper 2001)
pET16b-cadC- <i>NheI</i>	Amp <sup>R</sup>	<i>NheI</i> Restriktionsschnittstelle in <i>cadC</i>	diese Arbeit
pUC19	Amp <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
<b>Verkürzung der CadC-Linkerregion</b>			
pET16b-cadC-Δ104-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ104-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ105-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ105-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ106-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ106-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ107-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ107-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ108-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ108-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ109-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ109-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ115-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ115-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ120-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ120-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ128-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ128-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ133-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ133-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ145-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ145-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ146-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ146-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Δ152-158	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ152-158 in pET16b	diese Arbeit
<b>Verlängerung der CadC-Linkerregion</b>			
pET16b-cadC-2x120-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -2x120-151 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-2x145-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -2x145-151 in pET16b	diese Arbeit

<b>Aminosäuresubstitutionen im CadC-Linker</b>			
pET16b-cadC-E125A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E125A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-D131A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -D131A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E147A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E147A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>109</sup> AAAGAA <sup>114</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>109</sup> AAAGAA <sup>114</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>109</sup> RRRGRR <sup>114</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>109</sup> RRRGRR <sup>114</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>152</sup> ASAA <sup>155</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>152</sup> ASAA <sup>155</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>152</sup> ESEE <sup>155</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>152</sup> ESEE <sup>155</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>109</sup> RRRGRR <sup>114</sup> <sup>152</sup> ESEE <sup>155</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>109</sup> RRRGRR <sup>114</sup> <sup>152</sup> ESEE <sup>155</sup> in pET16b	diese Arbeit
<b>Aminosäuresubstitutionen in der DNA-bindenden Domäne</b>			
pET16b-cadC-R7A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -R7A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E10A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E10A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-R22A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -R22A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-R25A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -R25A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E30A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E30A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E30D	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E30D in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E30R	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E30R in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-R32A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -R32A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E46A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E46A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-R50A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -R50A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E52A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E52A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-R60A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -R60A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-V63A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -V63A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-N65A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -N65A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-H66A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -H66A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-T69A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -T69A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E74A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E74A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-D81A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -D81A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-D81N	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -D81N in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-D81E	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -D81E in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-N82A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -N82A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-D83A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -D83A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-E84A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -E84A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-D85A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -D85A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-K95A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -K95A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-R96A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -R96A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC-Y98A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Y98A in pET16b	diese Arbeit
<b>Generierung einer artifiziellen Helix</b>			
pET16b-cadC- <sup>146</sup> AEQSPV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> AEQSPV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>146</sup> PEASPV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> PEASPV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>146</sup> PEQAPV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> PEQAPV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>146</sup> PEQSAV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> PEQSAV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>146</sup> PEQSPA <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> PEQSPA <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>146</sup> AAAAAPV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> AAAAAPV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- <sup>146</sup> AAAAAV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> AAAAAV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit



pET16b-cadC- 146PEQSLV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> PEQSLV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- 146LLLLPV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> LLLLPV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- 146LLLLLV <sup>151</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>146</sup> LLLLLV <sup>151</sup> in pET16b	diese Arbeit
<b>Insertion von Prolinresten im CadC-Linker</b>			
pET16b-cadC- 119SPPPPPIE <sup>125</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>119</sup> SPPPPPIE <sup>125</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- 119SPPPPPE <sup>125</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>119</sup> SPPPPPE <sup>125</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- 119PPPPPPPE <sup>125</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>119</sup> PPPPPPPE <sup>125</sup> in pET16b	diese Arbeit
<b>Insertion einer S-Helix</b>			
pET16b-cadC- 104S-Helix <sup>185</sup>	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>104</sup> S-Helix <sup>185</sup> in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC- 159S-Helix_Ins	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> - <sup>159</sup> S-Helix_Ins in pET16b	diese Arbeit
<b>Insertion eines Elastin-Linkers</b>			
pET21a	Amp <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	Novagen
pET21a_cadC-E10	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> Δlinker mit Insertion von 10 Whd VPGEg	Schiller (persönl. Gabe)
pET21a_cadC-V10	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> Δlinker mit Insertion von 10 Whd VPGVG	Schiller (persönl. Gabe)
pET21a_cadC-V20	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> Δlinker mit Insertion von 20 Whd VPGVG	Schiller (persönl. Gabe)
pET21a_cadC-V4E	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> Δlinker mit Insertion von 5 Whd VPGVG u. 5 Whd VPGEg	Schiller (persönl. Gabe)
pET21a_cadC-K10	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> Δlinker mit Insertion von 10 Whd VPGKG	Schiller (persönl. Gabe)
<b>Protein-Protein-Interaktionsstudien</b>			
pUT18	Amp <sup>R</sup>	<i>ori</i> -ColE1 T18 Fragment für N-terminale Fusion	(Karimova <i>et al.</i> 1998)
pUT18C	Amp <sup>R</sup>	<i>ori</i> -ColE1 T18 Fragment für N-terminale Fusion	(Karimova <i>et al.</i> 1998)
pKT25	Kan <sup>R</sup>	<i>ori</i> -p15a T25 Fragment für C-terminale Fusion	(Karimova <i>et al.</i> 1998)
pKNT25	Kan <sup>R</sup>	<i>ori</i> -p15a T25 Fragment für C-terminale Fusion	(Karimova <i>et al.</i> 1998)
pUT18C-zip	Amp <sup>R</sup>	N-terminale CyaA-T18 Hefe-Leucinzipper Fusion	(Karimova <i>et al.</i> 1998)
pKT25-zip	Kan <sup>R</sup>	N-terminal CyaA-T25 Hefe-Leucinzipper Fusion	(Karimova <i>et al.</i> 1998)
pUT18C-cadC	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> in pUT18C	(Rauschmeier <i>et al.</i> 2014)
pKT25-cadC	Kan <sup>R</sup>	<i>cadC</i> in pKT25	(Rauschmeier <i>et al.</i> 2014)
pUT18C-cadC-Δ108-151	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ108-151 in pUT18C	diese Arbeit
pKT25-cadC-Δ108-151	Kan <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ108-151 in pKT25	diese Arbeit
pUT18-RpoA	Amp <sup>R</sup>	<i>rpoA</i> in pUT18	diese Arbeit
pUT18C-RpoA	Amp <sup>R</sup>	<i>rpoA</i> in pUT18C	diese Arbeit
pKT25-RpoA	Kan <sup>R</sup>	<i>rpoA</i> in pKT25	diese Arbeit
pKNT25-RpoA	Kan <sup>R</sup>	<i>rpoA</i> in p25N	diese Arbeit
<b>Reinigung von zytoplasmatischen CadC-Varianten</b>			
pBad24-cadC_1-103	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-103 in pBAD24	(Küper 2005)

pBad24-cadC_1-159	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-159 in pBAD24	(Küper 2005)
pET16b-cadC_1-103	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-103 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC_1-107	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-107 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC_1-114	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-114 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC_1-159	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-159 in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC_1-107_E30R	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-107_E30R in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC_1-107_R96A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-107_R96A in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC_1-159_E30R	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-159_E30R in pET16b	diese Arbeit
pET16b-cadC_1-159_R96A	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-159_R96A in pET16b	diese Arbeit
pETM11	Kan <sup>R</sup>	Klonierungs- u. Expressionsvektor	Schlundt (persönl. Gabe)
pETM11-cadC_1-107	Kan <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ108-512 in pETM11	Schlundt (persönl. Gabe)
pETM11-cadC_1-159	Kan <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ160-512 in pETM11	Schlundt (persönl. Gabe)
pETTrx1a	Kan <sup>R</sup>	Klonierungs- u. Expressionsvektor mit Trx-Fusion	Schlundt (persönl. Gabe)
pETTrx1a-cadC_1-107	Kan <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ108-512 in pETTrx1a	Schlundt (persönl. Gabe)
pETTrx1a-cadC_1-159	Kan <sup>R</sup>	<i>cadC</i> -Δ160-512 in pETTrx1a	Schlundt (persönl. Gabe)
pET32a	Amp <sup>R</sup>	Klonierungs- u. Expressionsvektor	Novagen
pET32a_cadC_1-159	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-159 in pET32a	diese Arbeit
pMal-c2	Amp <sup>R</sup>	Expressionsvektor mit Maltose-Bindeprotein-Fusion	NEB
pMal-c2_cadC_1-159	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-159 in pMal-c2	diese Arbeit
pTCadC_1-215_MalE	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-215 <i>malE</i> Fusion in pT7-5	(Kraxenberger 2006)
pTCadC_1-159_MalE	Amp <sup>R</sup>	<i>cadC</i> 1-159 <i>malE</i> Fusion in pT7-5	diese Arbeit
pBad33- <i>lysP</i>	Cm <sup>R</sup>	<i>lysP</i> in pBad33	(Rauschmeier <i>et al.</i> 2014)
<b>Gel-Retardationsexperimente</b>			
pUC19-P <sub><i>cadBA</i></sub>	Amp <sup>R</sup>	P <sub><i>cadBA</i></sub> in pUC19	(Ruiz <i>et al.</i> 2011)

Tab. 4 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
<b>Allgemein verwendete Oligonukleotide</b>	
T7 Promoter Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator Primer	CCGTTTAGAGGCCCAAGG
CadC_SOE2_ <i>SpeI</i> _anti	GAAAACGCTACTAGTGCTACACAG
MBP_sequ	GATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG
<b>Verkürzung der CadC-Linkerregion</b>	
CadC- <sup>151</sup> NheI <sup>152</sup> _fw	CCCCAGTTGCTAGCAAAAGCA
CadC- <sup>151</sup> NheI <sup>152</sup> _rev	TTGCTTTTGCTAGCAACTGGGG
CadC-NheI_Δ104-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCCGGCACCATT
CadC-NheI_Δ105-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCAACCGGCACC
CadC-NheI_Δ106-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCGATAACCGGC
CadC-NheI_Δ107-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCCCAGATAACC
CadC-NheI_Δ108-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCGTACCAGATA

CadC-NheI_Δ109-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCGCTGTACCAG
CadC-NheI_Δ115-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCTTCCTCTCCC
CadC-NheI_Δ120-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCCGAAGATAGC
CadC-NheI_Δ128-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCAACCGCCTCT
CadC-NheI_Δ133-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCAGAATCTGTG
CadC-NheI_Δ145-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCCGTTGCGGTG
CadC-NheI_Δ146-151_rev	TTGCTTTTGCTAGCTGGCGTTG
CadCI-Δ152-158_fw	CAATCCCCAGTTTGGGTATGGT
CadC-Δ152-158_rev	ACCATACCCAACTGGGGATTG
<b>Verlängerung der CadC-Linkerregion</b>	
CadC-2x120-151_2_fw	CCACCCCGCCGGAGCAGTCTCCGGTCCCTCCCCCTATACCA
CadC-2x120-151_2_rev	GGGACGGCTTCCGGGATCGGCGGCGGCGAAGATAGCATTAT
CadC-2x120-151_3_fw	GCCGTCTCATAGCCTGAATATCCAGAATACGGCCACCCCGCC
	GGAGC
CadC-2x120-151_3_rev	TATTCAGGCTATGAGACGGCGAGTCGGTCGCCGGGACGGCTT
	CCGGG
CadC-2x145-151_fw	CCGCCGGAGCAGTCTCCGGTCCACCTGAACAATCC
CadC-2x145-151_rev	GACCGGAGACTGCTCCGGCGGCGTTGCGGTGTTTTG
<b>Aminosäuresubstitutionen im CadC-Linker</b>	
CadC-E125A_fw	CTATACCAGCGGCGGTTCC
CadC-E125A_rev	GGAACCGCCGCTGGTATAG
CadC-D131A_fw	CTGCCACAGCTTCTCCCTC
CadC-D131A_rev	GAGGGAGAAGCTGTGGCAG
CadC-E147A_fw	CGCCACCTGCACAATCCCC
CadC-E147A_rev	GGGGATTGTGCAGGTGGCG
CadC- <sup>109</sup> AAAGAA <sup>114</sup> _fw	TGGTACAGCGCAGCAGCGGCAGCGGCAATAATGCTA
CadC- <sup>109</sup> AAAGAA <sup>114</sup> _rev	TAGCATTATTGCCGCTGCCGCTGCTGCGCTGTACCA
CadC- <sup>109</sup> RRRGRR <sup>114</sup> _fw	TGGTACAGCAGGAGGAGAGGAAGAAGGATAATGCTA
CadC- <sup>109</sup> RRRGRR <sup>114</sup> _rev	TAGCATTATCCTTCTTCCTCTCCTCCTGCTGTACCA
CadC- <sup>152</sup> ASAA <sup>155</sup> _fw	TCCCCAGTTGCAGCCGCAGCATTCACTACC
CadC- <sup>152</sup> ASAA <sup>155</sup> _rev	GGTAGTGAATGCTGCGGCTGCAACTGGGGA
CadC- <sup>152</sup> ESEE <sup>155</sup> _fw	TCCCCAGTTGAAAGCGAATTCACTACC
CadC- <sup>152</sup> ESEE <sup>155</sup> _rev	GGTAGTGAATTCTTCGCTTTCAACTGGGGA
<b>Aminosäuresubstitutionen in der DNA-bindenden Domäne</b>	
CadC-R7A_fw	CCTGTAGTTGCCGTTGGCGA
CadC-R7A_rev	TCGCCAACGGCAACTACAGG
CadC-E10A_fw	GCGTTGGCGCATGGCTTGT
CadC-E10A_rev	ACAAGCCATGCGCCAACGC
CadC-R22A_fw	AAATTAGCGCCAATGGGCG
CadC-R22A_rev	CGCCCATTTGGCGCTAATTT
CadC-R25A_fw	GCAATGGGGCTCAACTTAC
CadC-R25A_rev	GTAAGTTGAGCCCCATTGC
CadC-E30A_fw	TTACCCTTGCACCGAGATT
CadC-E30A_rev	AATCTCGGTGCAAGGGTAA
CadC-E30D_fw	TTACCCTTGACCCGAGATT
CadC-E30D_rev	AATCTCGGGTCAAGGGTAA
CadC-E30R_fw	TTACCCTTAGGCCGAGATT
CadC-E30R_rev	AATCTCGGCCTAAGGGTAA
CadC-R32A_fw	TTGAGCGGGCATTAATCGA
CadC-R32A_rev	TCGATTAATGCCCGCTCAA
CadC-E46A_fw	ACAGTGGCGCAGTACTTAG
CadC-E46A_rev	CTAAGTACTGCGCCACTGT
CadC-R50A_fw	TACTTAGCGCGGATGAACT
CadC-R50A_rev	AGTTCATCCGCGCTAAGTA
CadC-E52A_fw	GCAGGGATGCACTTATCGA

---

CadC-E52A_rev	TCGATAAGTGCATCCCTGC
CadC-R60A_fw	TCTGGAAGGCAAGTATTGT
CadC-R60A_rev	ACAATACTTGCCTTCCAGA
CadC-V63A_fw	GAAGTATTGCCACCAATCA
CadC-V63A_rev	TGATTGGTGGCAATACTTC
CadC-N65A_fw	ATTGTCACCGCTCACGTTGTG
CadC-N65A_rev	CACAACGTGAGCGGTGACAAT
CadC-H66A_fw	GTGACCAATGCCGTTGTGACG
CadC-H66A_rev	CGTCACAACGGCATTGGTGAC
CadC-T69A_fw	ACGTTGTGGCGCAGAGTAT
CadC-T69A_rev	ATACTCTGCGCCACAACGT
CadC-E74A_fw	GTATCTCAGCACTACGTAA
CadC-E74A_rev	TTACGTAGTGCTGAGATAC
CadC-D81A_fw	TCATTAAAAGCTAATGATGAA
CadC-D81A_rev	TTCATCATTAGCTTTTAATGA
CadC-D81N_fw	TCATTAAAAAATAATGATGAA
CadC-D81N_rev	TTCATCATTATTTTTTAATGA
CadC-D81E_fw	TCATTAAAAGAGAATGATGAA
CadC-D81E_rev	TTCATCATTCTCTTTTAATGA
CadC-N82A_fw	TTAAAAGATGCTGATGAAGAT
CadC-N82A_rev	ATCTTCATCAGCATCTTTTAA
CadC-D83A_fw	AAAGATAATGCTGAAGATAGT
CadC-D83A_rev	ACTATCTTCAGCATTATCTTT
CadC-E84A_fw	GATAATGATGCAGATAGTCCT
CadC-E84A_rev	AGGACTATCTGCATCATTATC
CadC-D85A_fw	AATGATGAAGCTAGTCCTGTC
CadC-D85A_rev	GACAGGACTAGCTTCATCATT
CadC-R96A_fw	TACCAAAGGCCGCTATAA
CadC-R96A_rev	TTATAGCCGCGCCTTGGTA
CadC-Y98A_fw	AGCGCGGCGCTAAATTAAT
CadC-Y98A_rev	ATTAATTTAGCGCCGCGCT

---

#### Generierung einer artifiziellen Helix

---

CadC- <sup>146</sup> AEQSPV <sup>151</sup> _fw	CAACGCCAGCTGAACAATC
CadC- <sup>146</sup> AEQSPV <sup>151</sup> _rev	GATTGTTTCAGCTGGCGTTG
CadC- <sup>146</sup> PEASPV <sup>151</sup> _fw	CACCTGAAGCATCCCCAGT
CadC- <sup>146</sup> PEASPV <sup>151</sup> _rev	ACTGGGGATGCTTCAGGTG
CadC- <sup>146</sup> PEQAPV <sup>151</sup> _fw	CTGAACAAGCCCCAGTTAA
CadC- <sup>146</sup> PEQAPV <sup>151</sup> _rev	TAACTGGGGCTTGTTTCAG
CadC- <sup>146</sup> PEQSAV <sup>151</sup> _fw	AACAATCCGCAGTTAAAAG
CadC- <sup>146</sup> PEQSAV <sup>151</sup> _rev	CTTTTAACTGCGGATTGTT
CadC- <sup>146</sup> PEQSPA <sup>151</sup> _fw	AATCCCCAGCTAAAAGCAA
CadC- <sup>146</sup> PEQSPA <sup>151</sup> _rev	TTGCTTTTAGCTGGGGATT
CadC- <sup>146</sup> AAAAPV <sup>151</sup> _fw	CCAGCTGCAGCAGCCCCAGTTAAAAGC
CadC- <sup>146</sup> AAAAPV <sup>151</sup> _rev	TGGGGCTGCTGCAGCTGGCGTTGCGGT
CadC- <sup>146</sup> AAAAAV <sup>151</sup> _fw	CCAGCTGCAGCAGCCGCAGTTAAAAGCAAA
CadC- <sup>146</sup> AAAAAV <sup>151</sup> _rev	AACTGCGGCTGCTGCAGCTGGCGTTGCGGT
CadC- <sup>146</sup> PEQSLV <sup>151</sup> _fw	AACAATCCCTAGTTAAAAG
CadC- <sup>146</sup> PEQSLV <sup>151</sup> _rev	CTTTTAACTAGGGATTGTT
CadC- <sup>146</sup> LLLLPV <sup>151</sup> _fw	CCACTTCTACTACTCCCAGTTAAAAGC
CadC- <sup>146</sup> LLLLPV <sup>151</sup> _rev	TGGGAGTAGTAGAAGTGGCGTTGCGGT
CadC- <sup>146</sup> LLLLLV <sup>151</sup> _fw	CCACTTCTACTACTCCTAGTTAAAAGCAAA
CadC- <sup>146</sup> LLLLLV <sup>151</sup> _rev	AACTAGGAGTAGTAGAAGTGGCGTTGCGGT

---

#### Insertion von Prolinresten im CadC-Linker

---

CadC- <sup>119</sup> SPPPIE <sup>125</sup> _fw	TTCGCCTCCCCCTCCAATAGAGGCG
CadC- <sup>119</sup> SPPPIE <sup>125</sup> _rev	CGCCTCTATTGGAGGGGGAGGCGAA

---

CadC- <sup>119</sup> SPPPPPPE <sup>125</sup> _fw	TTCGCCTCCCCCTCCTCCAGAGGCG
CadC- <sup>119</sup> SPPPPPPE <sup>125</sup> _rev	CGCCTCTGGAGGAGGGGGAGGCGAA
CadC- <sup>119</sup> PPPPPPPE <sup>125</sup> _fw	CTATCTCCTCCTCCCCCTCCACCAGAGG
CadC- <sup>119</sup> PPPPPPPE <sup>125</sup> _rev	CCTCTGGTGGAGGGGGAGGAGGAGATAG
<b>Insertion einer S-Helix</b>	
S-Helix_fw	CTGCTACAACCGTGGCGGCAAC
S-Helix_rev	GCAGGCTAACCGCCGTTTGCAT
CadC- <sup>104</sup> S-Helix <sup>185</sup> _1_fw	AATCAGATCCTCTCTTTTTTATGGCAGGCTAACCGCCGTTTGC ATTGGGTATGGTTTTT
CadC- <sup>104</sup> S-Helix <sup>185</sup> _2_fw	CTTGAGCAGCGGGTTCAGGAGAAAACCGCCGGGCTGGAGCAT AAAAATCAGATCCTCTCT
CadC- <sup>104</sup> S-Helix <sup>185</sup> _3_fw	TGAACAATATGTCTGCAGAACTGGCCGAAAGTTATGCCGTAC TTGAGCAGCGGGT
CadC- <sup>104</sup> S-Helix <sup>185</sup> _1_rev	CACTCGCCATTGCCAGCAGTTGCCGCCACGGTTGTAGCAGCG GCACCATTAAATTT
CadC- <sup>104</sup> S-Helix <sup>185</sup> _2_rev	GCCCGCTGATGTTTGC GCGTGGGTAAAATCGCGATGACTGAC GGCACTCGCCATTGCCA
CadC- <sup>104</sup> S-Helix <sup>185</sup> _3_rev	CAGACATATTGTTCAACGCAGTTCCAAGCATCGCCATTTTCGTT GCGCCCGCTGATGTTTG
CadC- <sup>159</sup> S-Helix_Ins_fw	AACCGCCGTTTGCATTGGGTATGGTTTTTT
CadC- <sup>159</sup> S-Helix_Ins_rev	CCACGGTTGTAGCAGAAAGGTAGTGAATCC
<b>Protein-Protein-Interaktionsstudien</b>	
CadC-2hybrid_sense	TTTCTAGAAATGCAACAACCTGTAGTTCGCGTT
N-CadC-2hybrid_as	TTGGATCCCCCTTCTGAAGCAAGAAATTTGTCGAGGATA
C-CadC-2hybrid_as	TTGGATCCTTATTCTGAACCAAGAAATTTGTCGAG
RpoA_fw	GTCGACTCTAGAAATGCAGGGTTCTGT
RpoA_rev	ACCCGGGGATCCGCCTCGTCAGCGATG
<b>Zytoplasmatische CadC-Varianten</b>	
CadC_1-107_fw	ATCTGGTACTAATAATAAAGCGAAG
CadC_1-107_rev	CTTCGCTTTATTATTAGTACCAGAT
CadC_1-114_fw	GGAGAGGAATAATAATAAATAATGC
CadC_1-114_rev	GCATTATTTATTATTATTCCTCTCC
<b>CadC-Hybridproteine</b>	
CadC_Trx_fw	GCGGCTAGCCTGGTGCCACGCGGTTCTTCTTCTGGTATGAGCG ATAAAATT
CadC_Trx_rev	CGCGGATCCGGCCAGGTTAGCGTC
CadC_MalE_fw	GCGCCTAGGCATCATCATCATCAT
CadC_MalE_rev	CGCGCTAGCACCAGAAGAAGAACC GCGTGGCACCAGAAAGG TAGTGAATCGTTTGC
<b>Gel-Retardationsexperimente</b>	
6-FAM uni24	[6-FAM]ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
rev24	TTACACACAGGAAACAGCTATGACC
<b>SPR-Messungen</b>	
Biotin_P <sub>cadBA</sub> _41_sense	[Btn]GGGGTTGTAAACATTAAATGTTTATCTTTTCATGATATCA ACTTGGGGG
P <sub>cadBA</sub> -41-anti	CCCCCAAGTTGATATCATGAAAAGATAAACATTTAATGTTTAC AACCC
[BTN]_yjiY_YehT_sense	[Btn]GGGGCCTTTGCCGCTCAACCGCAAACTGACCGCTTACA TCCCTAAAATAACCACTCAGTTAGGGG
yjiY_YehT_anti	CCCCTAACTGAGTGGTTATTTTAGGGATGTAAGCGGTCAGTTT TGCGGTTGAGCGGCAAAGGCCCC
<b>NMR-Messungen</b>	
NMR_Cad1_sense	TAAACATTAAATGTTTA
NMR_Cad1_anti	TAAACATTAAATGTTTA

---

NMR_lysP_sense	GTTCCAGCACGCGGGTC
NMR_lysP_anti	GACCCGCGTGCTGGAAC

---

### 4.3 Kultivierungsverfahren

Als Komplexmedium wurde Lysogeny-Broth (LB)-Medium (Miller 1972) verwendet. Dieses setzte sich zusammen aus 1% (w/v) Bacto-Trypton, 1% (w/v) NaCl und 0,5% (w/v) Hefeextrakt (Maniatis *et al.* 1989) und wurde gegebenenfalls mit 100 mM Natriumphosphatpuffer auf pH 5,8 oder 7,6 gepuffert. Als Minimalmedien (KE-Medium) wurden Phosphat-gepufferte Medien nach (Epstein & Kim 1971) verwendet, die 0,4% (w/v) Glukose als Kohlenstoff-Quelle enthielten und mit 100 mM Kalium-Phosphatpuffer bei pH 7,6 bzw. pH 5,8 oder für die pH-Bereichsmessungen auf pH 5,4; pH 5,6; pH 5,8; pH 6,0; pH 6,2; pH 6,4; pH 6,6; pH 6,8; pH 7,0; pH 7,2; pH 7,4; pH 7,6; pH 7,8 oder pH 8,0 gepuffert waren. Für die NMR-Studien erfolgte die Kultivierung in Phosphat-gepufferten <sup>15</sup>N-markiertem M9 Minimalmedium (9,35 mM <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl), das 0,4% Glukose oder 0,2% <sup>13</sup>C-Glukose als Kohlenstoffquelle enthielt. Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Antibiotika wurden in einer Endkonzentration von 100 µg/mL (Ampicillin, Carbenicillin), 50 µg/mL (Kanamycin, Streptomycin) und 34 µg/mL (Chloramphenicol) zugesetzt. Aerob erfolgte die Kultivierung bei 37°C, 200 rpm in Schikanekolben oder im Reagenzglas (5 mL, geschüttelt). Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem „Ultrospec 2100 pro“-Photometer der Firma Amersham Biosciences bestimmt.

#### 4.3.1 Bestimmung der CadC-vermittelten Signaltransduktion in vivo

Mikroaerophile Kultivierung wurde sowohl für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität (vgl. 5.5.10), als auch zur Bestimmung der Lysin-Decarboxylase-Aktivität (vgl. 5.5.11) genutzt. Hierfür wurden Ansätze mit einem Volumen von 10 mL in KE-Minimalmedium (Epstein & Kim 1971) unter leichtem Schwenken inkubiert, um das Sedimentieren der Zellen zu verhindern. Dadurch wurden in den fast vollständig gefüllten Reaktionsgefäßen mikroaerophile Bedingungen hergestellt. Für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden die Ansätze mit einer aeroben Übernachtskultur inokuliert (eingestellt: OD<sub>600</sub> ca. 0,05). Zusätzlich wurden in verschiedenen Ansätzen 10 mM Lysin zu den Medien zugesetzt. Bei OD<sub>600</sub> 0,3-0,7 wurden 1 ml der Zellen durch Zentrifugation

geerntet (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor Eppendorf A-4-44; 3 min, 4500 g, 37°C). Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

#### **4.3.2 In vivo Protein-Protein-Interaktionsstudie**

Für  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen wurde *E. coli* BTH101 mit Plasmiden, kodierend für die entsprechenden T18- und T25-Fusionsproteine, co-transformiert. Die VK wurden in 5 mL LB-Medium, versetzt mit 0,5 mM Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), aerob im Roller bei 30°C über Nacht inkubiert. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bei 30°C in KE-Minimalmedium, das mit Ampicillin, Kanamycin und IPTG supplementiert wurde. Die Zellernte erfolgte bei OD<sub>600</sub> 0,5-0,9 durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor Eppendorf A-4-44; 3 min, 4500 g, 37°C) und anschließend wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

#### **4.3.3 Lysin-Decarboxylase-Bestimmung (LDC-Differentialmedium)**

Um die Funktionalität von CadA in verschiedenen Stämmen nachweisen zu können, wurden die Kulturen über Nacht in Lysin-Decarboxylase-Medium [0,5% Pepton (w/v), 0,3% Hefeextrakt (w/v), 0,1% Glukose (w/v), 1% L-Lysin (w/v), 0,002% Bromkresolpurpur, pH 5,0] (Brooker *et al.* 1973; Möller 1955) anaerob bei 37°C kultiviert. Bei einer Funktionalität des Enzyms CadA wurde das Medium durch die Reaktion von L-Lysin zu Cadaverin und den dadurch resultierenden Antiport von Lysin in die Zelle und den Export von Cadaverin aus der Zelle alkalisiert (Neely & Olson 1996). Es kommt zu einem Farbumschlag von gelb zu blau.

#### **4.3.4 Überproduktion von Proteinen**

Zur Untersuchung der Lokalisation des Wildtyp-CadC und der CadC-Varianten wurden 20 mL steriles LB-Medium mit einer aeroben Übernachtskultur des jeweiligen Stammes inokuliert (eingestellt: OD<sub>600</sub> ca. 0,05) und aerob bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden bei einer OD<sub>600</sub> » 0,5 mit 0,5 mM IPTG induziert und CadC somit überproduziert. Nach einer weiteren dreistündigen, aeroben Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor Eppendorf A-4-44; 10 min, 4500 g, 4°C). Für die Präparation von Zellmembranen bzw. Zytosol und die anschließende Reinigung von His<sub>10</sub>-CadC und H<sub>10</sub>-CadC-Varianten wurden 1000 mL steriles M9-Minimalmedium mit einer aeroben Übernachtskultur des entsprechenden Stammes (BL21(DE3)pLysS-pET16b-*cadC*,

BL21(DE3)pLysS-pETM11-cadC oder BL21(DE3)pLysS-pETTrx1a-cadC (Wildtyp-His<sub>10</sub>-CadC und die His<sub>10</sub>-CadC-Varianten CadC<sub>1-107</sub>, CadC<sub>1-114</sub> und CadC<sub>1-159</sub>) inokuliert (eingestellt: OD<sub>600</sub> 0,05) und aerob bei 37°C kultiviert. Die Ansätze wurden bei einer OD<sub>600</sub> 0,5 mit 0,5 mM IPTG induziert und His<sub>10</sub>-CadC somit überproduziert. Nach einer weiteren aeroben Wachstumsphase über Nacht bei 20°C wurden die Zellen geerntet (Zellernte Sorvall<sup>®</sup> *Evolution*<sup>™</sup> RC; Rotor Sorvall SLC-6000; 7100 x g; 15 min; 4°C), einem Waschschrift unterzogen (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; Sorvall<sup>®</sup> *Evolution*<sup>™</sup> RC; Rotor Sorvall SLC-6000; 7100 x g; 15 min; 4°C) und anschließend das Zellfeuchtgewicht bestimmt. Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **4.3.5 Dauerkulturen**

Die Lagerung von Bakterienstämmen erfolgte in Glycerolkulturen. Hierfür wurden frisch kultivierte, stationäre Kulturen mit 17% (v/v) Glycerol versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Dauerkulturen wurden während der Laborzeit bei -20°C gelagert.

### **4.4 Molekularbiologische und genetische Methoden**

#### **4.4.1 Plasmidisolierung**

Plasmid-DNA wurde aus 5 mL aeroben Übernachtskulturen mittels des HiYield „Plasmid Mini-Kit“ (Süd-Laborbedarf, Gauting) nach Angaben des Herstellers isoliert, in 30 µL EB Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) oder Milli-Q H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### **4.4.2 Modifikation von DNA**

Die Standard DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach (Maniatis *et al.* 1989) und (Ausubel *et al.* 1987) und die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach (Mullis *et al.* 1986) durchgeführt. Die in vitro-Veränderungen von DNA-Molekülen, wie Restriktion und Ligation, wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Religation mit Alkalischer Phosphatase (AP) behandelt.



#### 4.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) verwendet, die mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurde zu den Proben 10x DNA-Probenpuffer (50% Glycerol (v/v); 0,1 M EDTA; 1% SDS (w/v); 0,1% Bromphenolblau (w/v)) gegeben. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente diente ein 2-log-Leiter-Standard der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt). Der Gellauf wurde in einer „Mini Sub DNA Cell GT“- bzw. „Wide Mini-Sub Cell GT“-Agarosegel-Laufkammer (BioRad, München) bei 100 V für 25-35 min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation der Gele mit einer „Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imager“-Fotodokumentationsanlage (Bio-Rad, München).

#### 4.4.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des HiYield „PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit“ (Süd-Laborbedarf, Garching) nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert. Die Konzentration an DNA wurde mit Hilfe des „NanoDrop ND-100 Spectrophotometer“ (NanoDrop Technologies) bestimmt.

#### 4.4.5 Markierung von DNA für Gel-Retardationsexperimente

Für in vitro Protein:DNA Wechselwirkungsexperimente mit gereinigtem Protein und Promotorbereichen wurde die DNA mit 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) markiert. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden jeweils in den Vektor pUC19 kloniert und mit den Oligonukleotiden rev-24 und 6-FAM-uni24 amplifiziert. Dazu wurde PHIRE-Polymerase verwendet. Das Oligonukleotid 6-FAM-uni24 war am 5'-Ende mit dem Farbstoff 6-FAM konjugiert. Dieser Farbstoff weist eine Absorptionswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 517 nm auf. 6-FAM markierte PCR-Produkte wurden mittels Diffusion aus TAE-Polyacrylamid-Gelen extrahiert. Die TAE Gelstücke wurden zerkleinert und für mindestens 6 h in Gel-Diffusionspuffer (0,1 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA; 10 mM Magnesiumacetat; 500 mM Ammoniumacetat; pH 8,0) inkubiert (Sigma 2003). Die Gelstücke wurden zentrifugiert und die DNA im Überstand mit 0,7-1 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wurde 30 min auf Eis präzipitiert, pelletiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 4°C, maximale

Geschwindigkeit, 20 min), zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µL sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 4.4.6 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“, welches auf dem nach (Sanger *et al.* 1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert. Die Sequenzierung wurde von Andreas Brachmann, Institut für Genetik, Ludwig-Maximilians-Universität, München mit Hilfe des „ABI Prism Model 3730“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

#### 4.4.7 Kompetente Zellen und Transformation

Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten RbCl-Methode (Promega 1994). Zur Präparation von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches Medium (LB) überimpft und aerob bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte bei 600 nm von 0,3-0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 4500 x g (Eppendorf Kühlzentrifuge) für 4 min abzentrifugiert und in dem halben Volumen kalter Lösung A (10 mM MOPS, pH 7,0; 10 mM RbCl) resuspendiert. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 4500 x g wurden die Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B (100 mM MOPS, pH 7,5; 50 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM RbCl) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Lösung B (10% des Ausgangsvolumens) aufgenommen und dann direkt für die Transformation verwendet. Für die Transformation wurden 200 µL kompetente Zellen zusammen mit 300 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1,5 min bei 42°C) wurde zu jedem Ansatz 1 mL LB gegeben und für eine Stunde aerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert. Bei Plasmidtransformation wurden 100 µL des Transformationsansatzes, bei Transformation mit Ligationsansätzen wurde der gesamte Ansatz in einem Volumen von 100 µL ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C.

#### 4.4.8 Konstruktion der Plasmide

Die Amplifizierung der Fragmente wurde mit Hilfe der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt) durchgeführt. Für die Konstruktion der Plasmide mit schrittweise verkürzter Linkerregion wurde der Vektor pET16b-cadC-*NheI* verwendet, welcher eine zusätzliche Klonierungsschnittstelle (über 2 Stufen-PCR eingefügt) zwischen dem zytoplasmatischen Linker und der Transmembrandomäne in CadC enthält. Die zusätzliche Restriktionsschnittstelle ermöglichte schnelles Klonieren der Linker-Verkürzungen. *cadC* wurde mit den Oligonukleotiden T7-Promotor und CadC -*NheI*\_Δ104-151\_rev (bzw. CadC-*NheI*\_Δ105-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ106-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ107-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ108-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ109-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ115-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ120-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ128-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ133-151\_rev, CadC-*NheI*\_Δ145-151\_rev und CadC-*NheI*\_Δ146-151\_rev) amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NheI* verdaut und in den mit denselben Enzymen verdauten Vektor pET16b-cadC-*NheI* kloniert. Dabei wurden Teile der Linkersequenz entfernt. pET16b-cadC-Δ152-158 wurde mittels 2-Stufen-PCR mit den Oligonukleotiden CadC-Δ152-158\_fw und CadC-Δ152-158\_rev amplifiziert, mit *NdeI* und *BamHI* verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pET16b-cadC kloniert. Die Konstruktion der CadC-Varianten mit verlängerter Linkerregion erfolgte auf die gleiche Weise. Ebenso wurden die Plasmide mit Aminosäuresubstitutionen in der zytoplasmatischen Domäne über 2-Stufen-PCR amplifiziert, mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten und in den Vektor pET16b-cadC ligiert. Zur Insertion der S-Helix in bzw. statt des Linkers in CadC wurde in einem ersten Schritt die S-Helix mit den Oligonukleotiden S-Helix\_fw und S-Helix\_rev aus MG1655 genomischer DNA amplifiziert. Die zusätzliche Insertion der S-Helix erfolgte über 2-Stufen PCR mit der amplifizierten S-Helix als Vorlage und den Primern CadC-<sup>159</sup>S-Helix\_Ins\_fw und CadC-<sup>159</sup>S-Helix\_Ins\_rev. Anschließend wurde mit den Enzymen *NdeI* und *SpeI* verdaut und in den Vektor pET16b-cadC kloniert. Die Insertion der S-Helix statt des Linkers erfolgte über 4-Stufen-PCR mit den Oligonukleotiden CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>\_1\_fw/CadC-SOE2\_*SpeI*\_anti, CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>\_1\_rev/T7 Promotor, CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>\_2\_fw/ CadC-SOE2\_*SpeI*\_anti, CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>\_2\_rev/T7 Promotor, CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>\_3\_fw/CadC-SOE2\_*SpeI*\_anti und CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>\_3\_rev/T7 Promotor. Die Fragmente wurden mit *NdeI* und *SpeI* verdaut und in pET16b-cadC kloniert. pUT18-RpoA, pUT18C-RpoA, pKT25-RpoA und PKnT25-RpoA für Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden mit den Oligonukleotiden RpoA\_fw und RpoA\_rev amplifiziert und mit den

Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BamHI* verdaut und in die mit den gleichen Enzymen verdauten Vektoren pUT18, pUT18C, pKT25 und pKNT25 kloniert. pUT18C-cadC-Δ108-151 und pKT25-cadC-Δ108-151 wurden mit Hilfe der Oligonukleotide CadC-2hybrid\_sense und N-CadC-2hybrid\_as bzw. C-CadC-2hybrid\_as amplifiziert. Die Restriktion und Ligation erfolgte wie für pUT18-RpoA, pUT18C-RpoA, pKT25-RpoA und pKNT25-RpoA. Die Vektoren pBad24-cadC\_1-103 und pBad24-cadC\_1-159 diente als Vorlage für die Klonierung von pET16b-cadC\_1-103 und pET16b-cadC\_1-159. Beide Vektoren wurden mit den Enzymen *NcoI* und *BamHI* verdaut und die CadC-Fragmente in den Vektor pET16b kloniert. pET16b-cadC\_1-107 und pET16b-cadC\_1-159 wurden mit Hilfe der Oligonukleotide CadC\_1-107\_fw und CadC\_1-107\_rev bzw. CadC\_1-114\_fw und CadC\_1-114\_rev über 2-Stufen PCR kloniert. Die Restriktion erfolgte mittels den Enzymen *NdeI* und *SpeI*. Als Vektor diente pET16b, welcher zuvor mit den gleichen Enzymen verdaut wurde. pET16b-cadC\_1-107\_E30R und pET16b-cadC\_1-159\_E30R wurden mit Hilfe der Oligonukleotide CadC-E30R\_fw und CadC-E30R\_rev hergestellt. Nach Verdau mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* erfolgte die Ligation in pET16b-cadC\_1-107 bzw. pET16b-cadC\_1-159. pTCadC\_1-159\_MalE mit einer C-terminalen CadC-MalE Fusion wurde mit Hilfe des Primerpaares CadC\_MalE\_fw und CadC\_MalE\_rev kloniert und über die Restriktionschnittstellen *NheI* und *BamHI* in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pTCadC\_1-215\_MalE kloniert. pMal-c2\_cadC\_1-159 wurde über Restriktion erstellt. pET16b-cadC\_1-159 wurde mit den Enzymen *XbaI* und *HindIII* verdaut und das Fragment in den mit denselben Endonukleasen geschnittenen Vektor pMal-c2 kloniert. pETTrx1a-cadC\_1-107 und pETTrx1a-cadC\_1-159 wurden wie pMal-c2\_cadC\_1-159 konstruiert, jedoch wurden die Enzyme *NcoI* und *BamHI* verwendet und als Vektor diente pET32a. Die konstruierten Plasmide wurden durch Sequenzierung (vgl. 4.4.6) überprüft.

#### 4.4.9 Stammkonstruktion

Um den Einfluss der Lokalisation von *cadC* zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt chromosomal ein zusätzliches *cadC*-Gen inseriert. Der Stamm LF1 (Fried *et al.* 2012) diente als Vorstufe zur Herstellung der chromosomalen Mutation. Die Transformation der Zellen mit linearer DNA wurde mittels Elektroporation nach Angaben des „Quick and Easy *E. coli* Deletion and Bac Modification Kits“ (Gene Bridges) Protokoll durchgeführt. Dafür wurden 1,4 mL einer LF1-pRed/ET Vorkultur bei 30°C und 950 rpm im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 kultiviert. Zur Induktion des Red/ET Plasmids wurde L-Arabinose in einer finalen

Konzentration von 0,35% (w/v) zugegeben. Nach einer einstündigen Induktionsphase (37°C, 950 rpm) wurden die Zellen geerntet (Eppendorf Zentrifuge 5415R, Rotor Eppendorf F-45-24-11), zwei Mal mit 1 mL 10% (v/v) Glycerol gewaschen und in 3% des Ausgangsvolumen resuspendiert. Die Zellen wurden 2 min mit linearer DNA (300 ng in einem Gesamtvolumen von 1,5 µL) auf Eis inkubiert und elektroporiert [MicroPulser (BioRad, München), 0,2 mm Küvetten, 2,5 kV, 1 Puls]. Das lineare DNA-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden *lacI*\_583bp\_sense/*lacI*\_anti, *lacZ*\_sense/*lacZ*\_500bp\_anti und *lacI-cadC*\_sense/*cadC*\_lacZ\_anti mittels 2-Stufen PCR hergestellt. Die Zellen wurden unmittelbar mit 1 mL LB-Medium versetzt, 3 h bei 37°C (950 rpm) inkubiert und auf entsprechenden Selektionsmedien ausgestrichen. Klone mit korrekt inseriertem zusätzlichen *cadC*-Gen wurden anhand von Streptomycin-Resistenz und Kanamycin-Sensitivität und Kontroll-PCR identifiziert. Um die chromosomale Lokalisation von *cadC* zu verändern, sollte in einem zweiten Schritt das native *cadC*-Gen des Stammes LF1-2xcadC deletiert werden. Durch erneute Red/ET vermittelte Rekombination wurde anschließend das native *cadC*-Gen durch eine *rpsL-neo*-Kassette ersetzt. Die (Gegen)-Selektion erfolgte mittels Resistenz gegenüber Kanamycin und Streptomycin-Sensitivität. Zum Nachweis der korrekten Insertion wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt und die PCR Produkte sequenziert (vgl. 4.4.6).

## 4.5 Biochemische und analytische Methoden

### 4.5.1 Präparation von Membranproteinen und Zytosol mittels Ultraschall

Die Kultivierung zur Präparation von CadC und CadC-Varianten wurde wie unter Punkt 4.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellpellets wurden in Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% (v/v) Glycerol; 0,5 mM PMSF; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 30 ng/mL DNase) resuspendiert und in Gegenwart von 10 µg/mL Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin durch Ultraschallbehandlung mit einem Modell der Firma Branson (Sonifier® W-250D) aufgeschlossen (Amplitude 10%; 20 s; Puls 0,5 s/0,5 s), Zelltrümmer sowie nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch eine niedertourige Zentrifugation bei 16000 x g (10 min, 4°C) entfernt. Bei einer darauf folgenden Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge Sorvall® Discovery M120; Rotor S100AT4; 84.144 x g; 60 min; 4°C) wurden die zytosolischen Proteine von den Membranen getrennt. Die Membranvesikel wurden in 30 µL TG-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% (v/v) Glycerol) aufgenommen. Zytosol und Membranen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

## 4.5.2 Reinigung von Proteinen

### 4.5.2.1 Solubilisierung und Reinigung von CadC und CadC $\Delta$ 108-151

Für die Solubilisierung wurden die Membranvesikel in einer Endkonzentration von 4-5 mg/mL Protein mit 2% (v/v) Lauryldimethylaminoxid (LDAO) in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) 600 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol und 2 mM DTT versetzt. Dazu wurde eine 6,67%ige (v/v) Detergenzlösung innerhalb von 5 min schrittweise zum Solubilisierungsansatz gegeben, insgesamt wurde 30 min unter Rühren auf Eis solubilisiert. Anschließend folgte ein Ultrazentrifugationsschritt (Ultrazentrifuge Sorvall® *Discovery* M120; Rotor S100AT4; 84.144 x g; 60 min; 4°C), der Überstand enthielt die solubilisierten Proteine. Die Reinigung von CadC und CadC $\Delta$ 108-151 aus dem Solubilisat erfolgte nach dem Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. Hierfür wurde Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose auf eine Reinigungssäule (Qiagen, Hilden) geladen, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Reinigungspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 2 mM DTT; 10% (v/v) Glycerol; 600 mM NaCl; 0,05 % (v/v) LDAO] äquilibriert. Zur Bindung des gelösten Proteins wurde die äquilibrierte Agarose zum Solubilisat [nach Zugabe von NaCl (Endkonzentration: 600 mM) und Imidazol (Endkonzentration: 30 mM)] gegeben, in einem 50 mL-Falcon-Röhrchen vereinigt und 30 min bei 4°C auf einer Wippe geschwenkt. Nach Verwerfen der nicht-gebundenen Proteine und Waschen der Matrix mit Reinigungspuffer wurde die Elution mit Reinigungspuffer, der 250 mM Imidazol enthielt, durchgeführt. Gereinigtes Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 4.5.2.2 Solubilisierung und Reinigung von LysP

Für die Quervernetzungsstudien erfolgte die Solubilisierung von LysP aus invertierten Membranvesikeln von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pBad33-*lysP* wie unter 4.5.2.1 für CadC beschrieben, allerdings wurde als Solubilisierungspuffer 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0), 10% (v/v) Glycerol, 2 mM (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1% (w/v) *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid verwendet. Die Reinigung von LysP aus dem Solubilisat wurde ähnlich wie für CadC beschrieben durchgeführt, der Reinigungspuffer setzte sich jedoch aus 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,6), 10% (v/v) Glycerol, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 300 mM KCl, 0,04% (w/v) *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid und 15 mM Imidazol zusammen. Für die Elution wurde die Imidazol-Konzentration im Reinigungspuffer auf 250 mM erhöht. Solubilisiertes und gereinigtes LysP wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.5.2.3 Reinigung von löslichen CadC-Varianten

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Sattler (Lehrstuhl für Biomolekulare NMR-Spektroskopie der TU München) wurden Versuche zur Strukturaufklärung von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie durchgeführt. Die Reinigung von löslichen CadC-Varianten für die NMR-Experimente, Protein-DNA-Interaktionsstudien und Kristallisationsversuche wurde - ohne vorhergehende Solubilisierung - wie unter 4.5.2.1 für CadC beschrieben, durchgeführt. Der Reinigungspuffer setzte sich aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM DTT; 12 mM Imidazol und 280 mM NaCl zusammen. Für die Elution wurde die Imidazol-Konzentration auf 350 mM erhöht. Der His<sub>6</sub>-Tag von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> für die NMR-Studien konnte mittels einer TEV-Protease abgespalten werden. Hierfür mit 500 µg/L TEV-Protease für 3 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend wurde der Überstand ankonzentriert (Vivaspin 20) und einer Gelfiltration (Säule: Superdex 75 10/300 GL von GE Healthcare, Braunschweig) mit anschließender Ionenaustauschchromatographie (Säule: MonoQ HR 5/5 von GE Healthcare, Braunschweig) unterzogen. Die Durchführung der Gelfiltration und der Ionenaustauschchromatographie erfolgte am Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie am Department Chemie der TU München. Um für DNA-Protein-Interaktionsstudien das Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde eine schrittweise Dialyse gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 150 mM NaCl bei 4°C durchgeführt. Gereinigtes Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Kristallisation wurde von Dr. Andreas Schlundt und Dr. Robert Janowski am deutschen Elektronen-Synchrotron DESY der Helmholtz-Gemeinschaft in Hamburg durchgeführt.

#### 4.5.2.4 Reinigung von löslichen MalE-CadC-Varianten

Die Reinigung von MalE-CadC<sub>1-159</sub> und CadC<sub>1-159</sub>\_MalE aus dem Zytosol von *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformiert mit pMal-c2-CadC1-159 bzw. pTCadC\_1-159\_MalE, erfolgte nach dem Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. Hierfür wurde in der Regel 1 mL Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose auf eine Reinigungssäule (Qiagen) geladen, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 60 mL Reinigungspuffer (50 mM TrisHCl, pH 7; 150 mM NaCl; 5% (v/v) Glycerol; 2 mM (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 mM Imidazol) äquilibriert. Zur Bindung des gelösten Proteins wurde die äquilibrierte Agarose zu 20 mL Zytosol [nach Zugabe von NaCl (Endkonzentration: 150 mM) und Imidazol (Endkonzentration: 10 mM)] gegeben, in einem 50 mL-Falcon-Röhrchen vereinigt und 1 h bei

4°C auf einer Wippe geschwenkt. Nach Verwerfen der nicht-gebundenen Proteine und Waschen der Agarose mit 60 mL Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7; 150 mM NaCl; 5% (v/v) Glycerol; 2 mM (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 30 mM Imidazol) erfolgte die Elution 7 x mit je 1 mL Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7; 150 mM NaCl; 5% (v/v) Glycerol; 2 mM (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 250 mM Imidazol). Gereinigtes Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.5.2.5 Reinigung von löslichen Trx-CadC-Varianten

Die Reinigung von Trx-CadC<sub>1-159</sub> aus dem Zytosol von *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformiert mit pET32a-cadC<sub>1-159</sub>\_Trx erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. Die Reinigung von Trx-CadC<sub>1-159</sub> wurde ähnlich wie für CadC beschrieben durchgeführt (4.5.2.1), der Reinigungspuffer setzte sich jedoch aus 100 mM Tris/HCl (pH 7,0), 150 mM NaCl, 2 mM (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, und 20 mM Imidazol zusammen. Die Elution erfolgte 5 x mit je 1 mL Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 6,3; 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 100 mM Imidazol). Gereinigtes Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.5.3 Rekonstitution CadC und LysP

Gereinigtes LysP bzw. CadC oder CadC $\Delta$ 108-151 wurde gemäß der von (Jung *et al.* 1997) abgewandelten Methode nach (Rigaud *et al.* 1995) in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden rekonstituiert. Bei dieser Detergenz-vermittelten Rekonstitution wurden die Liposomen durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 [0,47% (v/v)] partiell solubilisiert. Anschließend wurde in einem äquimolaren Verhältnis gereinigtes CadC, CadC $\Delta$ 108-151 und LysP in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 25:1 zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von BioBeads, um die Detergenzien zu entfernen. Die BioBeads wurden in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 5:1 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt, danach wurde noch einmal die gleiche Menge BioBeads zugegeben und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Über Nacht wurden bei 4°C die BioBeads in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 10:1 zugegeben, das Protein-Lipidgemisch wurde nach Inkubation mit einer Kanüle abgenommen. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt (Ultrazentrifuge Sorvall® Discovery M120; Rotor S100AT4; 84.144 x g; 60 min; 4°C) wurden die fertigen Proteoliposomen in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl



(pH 7,5); 10% (v/v) Glycerol] aufgenommen, und die Proteoliposomen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proteoliposomen erfolgte bei -80°C.

#### 4.5.4 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach dem Protokoll von (Lowry *et al.* 1951) durchgeführt. Der Proteingehalt in Membranen wurde mit Hilfe des modifizierten Protokolls nach (Peterson 1977) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden von 0 bis 25 µg Protein wurde BSA (Bovine Serume Albumine, AppliChem, Darmstadt) verwendet.

#### 4.5.5 Quervernetzungsstudien

Für Quervernetzungsstudien wurden 10 µM co-rekonstituiertes CadC + LysP eingesetzt. Als Reaktionspuffer wurde 20 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2) und 10% (v/v) Glycerol verwendet. Die unter 4.5.3 hergestellten Proteoliposomen wurden mehrmals mit diesem Puffer gewaschen und darin resuspendiert. Zu den co-rekonstituierten Proteinen wurden jeweils 100 µM Disuccinimidylsuberat (DSS) gegeben. Die Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die Reaktion mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) für 15 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels 7,5% SDS-PAGE (4.5.6). Als Negativkontrolle wurde CadC mit PutP (persönliche Gabe Dr. Martina Rauschmeier) co-rekonstituiert und ebenfalls mit DSS inkubiert.

#### 4.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteinfärbung

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach (Laemmli 1970). Nicht-kovalente Wechselwirkungen der nativen Proteine wurden durch die Zugabe von Sodiumdodecylsulfat (SDS) zerstört. Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 10 x 10 cm bzw. 14 x 16 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9%, im Trenngel 12,5%. Die Proben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer (25 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (v/v) Glycerol; 2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,005% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und anschließend auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Standard wurde *PageRuler® Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Der Gellauf wurde in einer „Perfect Blue Doppelsystem TwinS bzw. M“- Anlage (BioRad, München) bei 200 V in Lämmli-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH

8,2-8,3) durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) nach (Weber & Osborn 1969) detektiert, die Entfärbung der Gele erfolgte in 5% (v/v) Methanol und 7,5% (v/v) Essigsäure. Alternativ wurde eine sensitivere Detektion der Proteine mittels Silberfärbung (Blum *et al.* 1987) erzielt.

#### **4.5.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit His<sub>10</sub>-Affinitätstag: Western Blot**

Die in einer SDS-PAGE nach (Laemmli 1970) aufgetrennten Proteine wurden mittels Nassblot-Apparatur (Peqlab) durch horizontale Elektrophorese für 120 min bei 300 mA bzw. über Nacht bei 100 mA (Flachgele der Größe 10 x 10 cm) und für 90 min bei 800 mA bzw. über Nacht bei 200 mA (Flachgele der Größe 14 x 16 cm), 4°C auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell; Porendurchmesser 0,45 µm) transferiert: Western Blot, Protokoll nach (Towbin *et al.* 1979). Dafür wurden die Membran und das Filterpapier kurz zuvor in Blot-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) eingelegt. Nach dem Blot-Vorgang wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) mit 3% (w/v) BSA zur Absättigung unspezifischer Bindestellen inkubiert. Als erster Antikörper wurde ein Penta-His-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:2000 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur (RT) in TBS mit 3% (w/v) BSA inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierter Anti-Maus-IgG Antikörper, der in einer Endkonzentration von 1:5000 eingesetzt und 1 h bei RT in TBS mit 3% (w/v) BSA inkubiert wurde. Für den mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper wurde der Immunoblot durch Zugabe einer Färbesubstratlösung (50 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5; 0,01% (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium; 0,045% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) entwickelt.

#### **4.5.8 Gel-Retardationsexperimente**

DNA:Protein Interaktionen wurden mittels Gel-Retardationsexperimenten visualisiert. Die Versuchsanordnungen orientierten sich an (Hellman & Fried 2007). CadC und CadC-Varianten wurden seriell verdünnt (1:2), mit 30 fmol 6-FAM-markierter DNA inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Protein-Komplexe wandern bei gelelektrophoretischer Auftrennung langsamer als freie DNA. Gereinigtes CadC wurde zunächst in Verdünnungspuffer (50mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 10% (v/v) Glycerol) seriell verdünnt und anschließend mit 150 ng Lachssperma DNA (unspezifischer Kompetitor) und dem zu testenden DNA Fragment (30 fmol) inkubiert. Das Probenvolumen betrug 27,5

μL. Die Endkonzentrationen im Reaktionsansatz waren 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 6 % (v/v) Glycerol, 5,45 ng/μL Lachssperma DNA, 1,1 nM 6-FAM-markierte DNA, 0,136 μg/mL BSA und variable Konzentrationen an CadC. Die Reaktionsansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 7,5%-iges (w/v) natives 0,5-fach gepuffertes TAE-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Laufpuffer diente ebenso 0,5xTAE. Der Gellauf wurde 3 h bei 70 V durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit Hilfe eines Typhoon Scanners („Typhoon Trio Variable Mode Imager 1 Scanner“, Amersham Bioscience) unter einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsfilter der Wellenlänge 526 nm aufgenommen (Zianni *et al.* 2006).

#### 4.5.9 Messung von DNA-Bindeaffinitäten mit Biacore T200

Die Analyse der DNA-Affinität von CadC und CadC-Varianten erfolgte durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie am BiacoreT200 der Firma GE Healthcare. Dazu wurde ein mit Streptavidin beschichteter Carboxymethyl Dextran Sensorchip (SA Sensor Chip Series S) verwendet. Alle Experimente fanden bei 25°C mit HBS-EP als Laufpuffer pH 7,4 oder pH 6,0 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl; 3 mM EDTA) und einer Flussrate von 30 μL/min statt. Als DNA-Fragment wurde ein Bereich von 41 bp des *cadBA*-Promotors, der die Cad1 Bindestelle komplett abdeckt, gewählt. Als DNA-Kontrollfragment wurde ein Fragment des *yjiY*-Promotors verwendet. Zur Generierung einer Doppelhelix wurden entsprechende komplementäre Primerpaare 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Äquilibration der Sensorchips fand vor der Immobilisierung der DNA-Fragmente (*cadBA*-DNA und *yjiY*-DNA) mit drei Injektionen 1 M NaCl und 50 mM NaOH bei einer Flussrate von 10 μL/min statt. Zum Waschen des Chips wurden 1 M NaCl, 50 mM NaOH und 50% (v/v) Isopropanol verwendet. Etwa 200-300 RU der jeweiligen DNA-Fragmente wurden auf die Oberfläche der Flusszellen gebunden. Das Protein floss in verschiedenen Konzentration (0,01 μM- 10 μM) mit einer Kontaktzeit von 180 sec gefolgt von 300 sec Dissoziationszeit in HBS-EP-Puffer über alle Flusszellen. Nach jedem Zyklus erfolgte die Regeneration der Oberfläche des Chips mittels Injektion von 2,5 M NaCl für 30 sec bei 60 μL/min Flussrate und einem zweiten Schritt mit 0,5 % (w/v) SDS bei 60 μL/min. Sensorgramme wurden mit Hilfe der Biacore Control Software 1.0 (GE Healthcare, Braunschweig) aufgezeichnet und mit Hilfe der Biacore T200 Evaluation Software 1.0 (GE Healthcare, Braunschweig) analysiert. Die Oberfläche der Flusszelle 1 wurde mit *yjiY*-DNA als Leerwert für die Subtraktion des „Bulk Refractive Index

Hintergrunds“ beladen. Alle Sensorgramme wurden auf die Grundlinie 0 normalisiert. „*calibration-free concentration analysis*“ (CFCA) wurde mit 5  $\mu\text{M}$  CadC<sub>1-159</sub>\_E30R, welches schrittweise 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt wurde, durchgeführt. Jede Proteinverdünnung wurde zweimal injiziert, sowohl bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{l/min}$  als auch bei 100  $\mu\text{l/min}$ . Die aktive Flusszelle wurde mit einem 41 bp Fragment des *cadBA*-Promotors zur Bindung von CadC<sub>1-159</sub>\_E30R beladen, die Referenzzelle mit *yjiY*-DNA. Im Allgemeinen beruht CFCA auf dem Stofftransport. Unter Stofftransport wird ein Diffusionsphänomen verstanden, welches die Bewegung von Molekülen zwischen einer Lösung und der Oberfläche beschreibt. CFCA beruht daher auf der Messung der beobachteten Bindungsrate während der Probeninjektion unter teilweise oder vollständig Stofftransport-limitierenden Bedingungen. Die initiale Bindungsrate ( $dR/dt$ ) wird abhängig von der Diffusionskonstante des Proteins unter zwei verschiedenen Flussraten gemessen. Der Diffusionskoeffizient von CadC<sub>1-159</sub>\_E30R wurde mittels des „Biacore diffusion constant calculator“ and „converter webtools“ ([https://www.biacore.com/lifesciences/Application\\_Support/online\\_support/Diffusion\\_Coefficient\\_Calculator/index.html](https://www.biacore.com/lifesciences/Application_Support/online_support/Diffusion_Coefficient_Calculator/index.html)) analysiert. Die „aktive“ Proteinkonzentration wurde für die Kalkulation der Bindekinetikkonstanten verwendet. Alle Messungen erfolgten in Kooperation mit PD Dr. Ralf Heermann am Department Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität.

#### 4.5.10 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung

##### 4.5.10.1 Nachweis der Aktivität von CadC über kolorimetrischen Plattentest

Für den kolorimetrischen Plattentest wurde der Reporterstamm EP314 mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Dieser verfügt über eine chromosomal kodierte *cadA-lacZ* Fusion (Neely *et al.* 1994). Die Zellen wurden auf Agarplatten mit Minimalmedium nach Epstein und Kim (1971), pH 5,8 und pH 7,6 mit 1 mg/20 mL (w/v) X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) und in An- oder Abwesenheit von Lysin in einer Endkonzentration von 10 mM bei 37°C inkubiert. Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase (kodiert durch *lacZ*) wandelt X-Gal in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl um, welches mit dem Sauerstoff der Luft zum blau pigmentierten Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-indigo wird.

#### 4.5.10.2 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung nach Miller (1972)

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach dem Protokoll von Miller bestimmt (Miller 1972). Für den Test wurde je 1 mL Zellkultur der Proben bei 16000 x g zentrifugiert und in 1 mL Puffer Z (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 7,0) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Chloroform und 50  $\mu\text{L}$  0,1% (w/v) SDS permeabilisiert, gevortex und 5 min bei 30°C inkubiert. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 200  $\mu\text{L}$  ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid [4 mg/mL] zu den Proben gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  [1 M] nach ausreichender Gelbfärbung der Proben abgestoppt und die Reaktionszeit notiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min entfernt. Die Intensität der durch die Reaktion hervorgerufenen Färbung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Die Aktivität wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Aktivität [Miller-Units]} = (A_{420\text{nm}} \cdot 1000) / (t [\text{min}] \cdot V [\text{mL}] \cdot \text{OD}_{600})$$

#### 4.5.11 Lysin-Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung

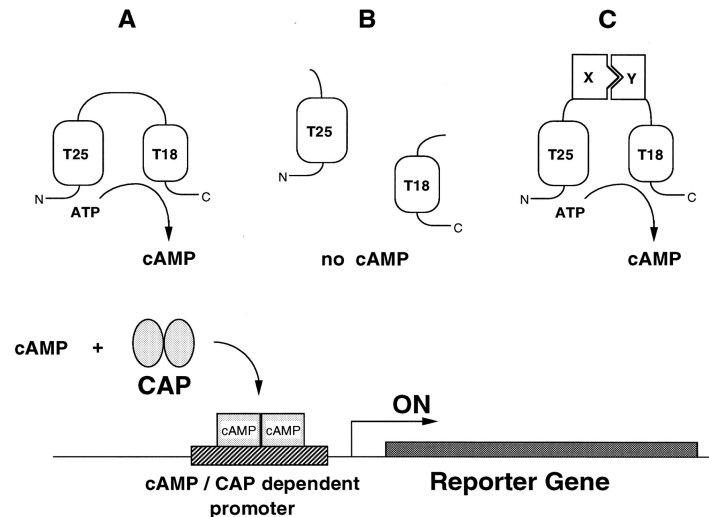
Die Bestimmung der Lysin-Decarboxylase-Aktivität erfolgte wie bei (Lemonnier & Lane 1998) beschrieben, allerdings in einer verkürzten Version. Diese wurde mit intakten Zellen durchgeführt, wie es durch (Phan *et al.* 1982) erstmalig beschrieben wurde. Die Zellen wurden wie unter Punkt 4.3 beschrieben, kultiviert. 1 mL Zellkultur der jeweiligen Proben wurden in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 16000 x g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 1 mL kaltem Waschpuffer (1 M NaCl in 0,05 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 6,5) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die  $\text{OD}_{600}$  wurde bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert. Die Pellets wurden in dem entsprechenden Volumen 20 mM Kalium-Phosphatpuffers (pH 5,6) resuspendiert, so dass sich eine Optische Dichte bei 600 nm von 1 ergab. Zu 200  $\mu\text{L}$  der Suspension wurden 20  $\mu\text{L}$  Chloroform gegeben, gevortex und der Ansatz auf Eis inkubiert. CadA hat eine maximale Aktivität bei einem pH-Wert von 5,8. Aus diesem Grund war der Reaktionsansatz für die Lysin-Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung mit 16 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 5,8) gepuffert. Als Substrat der Reaktion wurden 5 mM Lysin zugesetzt, außerdem Pyridoxalphosphat, ein essentieller Cofaktor für die Reaktion, in einer Endkonzentration von 0,1 mM. Zu den vorgewärmten Reaktionsansätzen (37°C, Endvolumen 120  $\mu\text{L}$ ) wurden 10  $\mu\text{L}$  der mit Chloroform aufgeschlossenen Probe gegeben.

Parallel zu den Ansätzen mit Lysin wurden Reaktionsansätze ohne Lysin entsprechend durchgeführt. Beide wurden für 15 min bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. In diesem Schritt wird Lysin zu Cadaverin und CO<sub>2</sub> umgesetzt. Durch die Zugabe von 120 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [1 M] erhielt der Ansatz einen alkalischen pH-Wert und wurde auf die anschließende Derivatisierung durch TNBS (120 µL einer 10 mM Lösung) vorbereitet. Die Ansätze wurden für 4 min bei 40°C inkubiert und daraufhin sofort auf Eis gestellt. Durch die Zugabe von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure entstehen die Derivate N,N-bis-nitrophenyllysin und N,N-bis-nitrophenylcadaverin. Das Cadaverin-Derivat ist in organischen Lösungsmitteln wie Toluol löslich, während das Lysin-Derivat aufgrund der Carboxylgruppe in Toluol unlöslich ist. Um eine Trennung der beiden Derivate zu erreichen, wurden die Proben mit 1 mL Toluol extrahiert (Vortexen jeder Probe für 20 s). Nach einer Zentrifugation (16000 x g, 2 min, RT) wurde die gebildete Cadaverinmenge photometrisch bestimmt, da die Nitrophenylgruppen der Cadaverinderivate ein Absorptionsmaximum bei 340 nm aufweisen. Für die photometrische Messung wurde die organische Phase der Ansätze in Quarzküvetten (Helma, Müllheim) überführt. Anhand einer TNBS-Cadaverin-Eichgeraden konnte die TNBS-Cadaverin-Konzentration in der Probe bestimmt und daraus die Lysin-Decarboxylase-Aktivität errechnet werden, wobei eine Absorption von 1 bei 340 nm etwa 106 nmol Cadaverin entsprach (persönliche Kommunikation Dr. Ina Haneburger).

Die spezifische Aktivität wurde definiert als µmol /min • mg Protein.

#### **4.5.12 In vivo Studien zur Interaktion von Proteinen: Bacterial-*Two-Hybrid* System**

Dieses System basiert auf der Spaltung der zwei komplementären Untereinheiten der Adenylatzyklase aus *Bordella pertussis* in die zwei Fragmente T18 und T25 (Karimova *et al.* 1998). Die Fragmente T18 und T25 alleine haben keine Adenylatzyklase-Aktivität, kommen beide jedoch in unmittelbare Nähe zueinander wird vollständige Adenylatzyklase-Aktivität erreicht.



**Abb. 5: Prinzip des Adenylatzyklase basierten *Two-Hybrid* Systems (BACTH) (Karimova *et al.* 1998).** Protein-Protein-Interaktionen wurden mit Hilfe des BACTH-Systems analysiert. Dieses System beruht auf der funktionalen Rekonstitution der T18- und T25- Untereinheiten der Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis*, deren katalytische Aktivität die Basis der CAP-induzierten Expression von *lacZ* repräsentiert. Die resultierende  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt ein Maß für die Stärke der Protein-Protein-Interaktion dar und wurde wie unter 4.5.10.2 beschrieben bestimmt.

Bei Protein-Interaktion komplementieren die Untereinheiten und es entsteht eine funktionsfähige Adenylatzyklase, die cAMP aus ATP herstellt. CAP bindet im Komplex mit cAMP an die Promotorregion des Reportergens, in diesem Fall das *lac*-Operon. Dies erlaubt Expression von *lacZ* und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kann gemessen werden. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt ein Maß für die Stärke der Protein-Protein-Interaktion dar. Proteine lassen sich N-terminal (pKT25 und pUT18C) oder C-terminal (pKNT25 und pUT18C) an die jeweilige Untereinheit fusionieren. Hierfür wurden *rpoA* in pKNT25, pKT25, pUT18 und pUT18C und *cadCA108-151* in pKT25 und pUT18C kloniert. Der *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit den Plasmiden co-transformiert und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde wie unter 4.5.10.2 beschrieben gemessen.

## 4.6 Bioinformatische Analysen

Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden mit Hilfe des Programms OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) (Kibbe 2007) konstruiert. Solange ein direkter experimenteller Funktionsnachweis nicht möglich ist, stellen computergestützte Sekundärstrukturanalysen von Aminosäuresequenzen den ersten Schritt zur Charakterisierung von unbekannten,

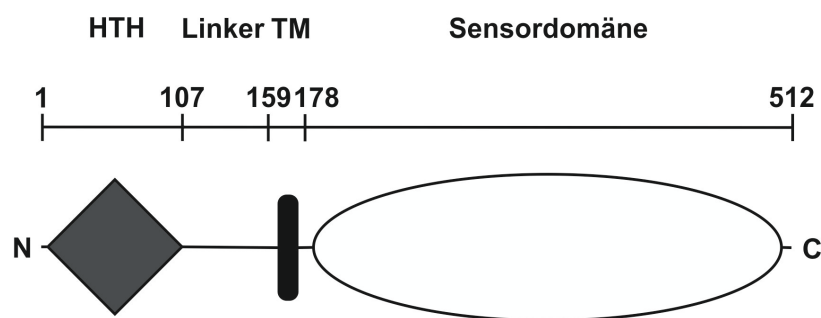
ausschließlich aus der Gensequenz abgeleiteten Proteinen dar. Die Sekundärstrukturanalyse von CadC erfolgte computergestützt mit Hilfe des Moduls PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) (Jones 1999) des “ExPASy Proteomics Server”. Um die CadC-Sequenz von *E. coli* mit homologen Proteinen weiterer Mikroorganismen zu vergleichen, wurden Sequenz-Alignments mit Hilfe der NCBI Datenbank ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez /query.fcgi?db=Protein&itool=toolbar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein&itool=toolbar)) (Sayers *et al.* 2011) und Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) (Sievers *et al.* 2011) erstellt. Zum Erstellen von molekularen Graphiken wurde Pymol ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) (DeLano 2002) verwendet.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung des zytoplasmatischen Linkers in CadC

Die Domänenstruktur des Transkriptionsaktivators CadC gliedert sich in eine N-terminale DNA-bindende Domäne (As 1-107), eine C-terminale periplasmatische Sensordomäne (As 179-512) und eine einzelne Transmembranhelix (As 159-178) (Dell *et al.* 1994; Haneburger *et al.* 2011; Watson *et al.* 1992). Eine zytoplasmatische Linkerregion (As 108-158) verbindet die DNA-bindende Domäne und die Transmembranhelix in CadC (Abb. 6). Da diese Region als verbindendes Glied zwischen zwei elementaren Domänen agiert, ist eine Rolle dieses Bereichs in der Signalweiterleitung zu vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels bioinformatischer Analysen und molekularbiologischer Experimente erstmals der Fokus auf die Linkerregion von CadC gelegt und der Mechanismus der Signaltransduktion von der Transmembranhelix via des Linkers zur DNA-Bindedomäne untersucht.



**Abb. 6. Domänenarchitektur von *E. coli* CadC.** *E. coli* CadC ist aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne (As 1-107), einer zytoplasmatischen Linkerregion (As 108-158), einer C-terminalen Sensordomäne (As 179-512) und einer einzelnen Transmembranhelix (As 159-178) aufgebaut.

#### 5.1.1 Bioinformatische Analyse von CadC

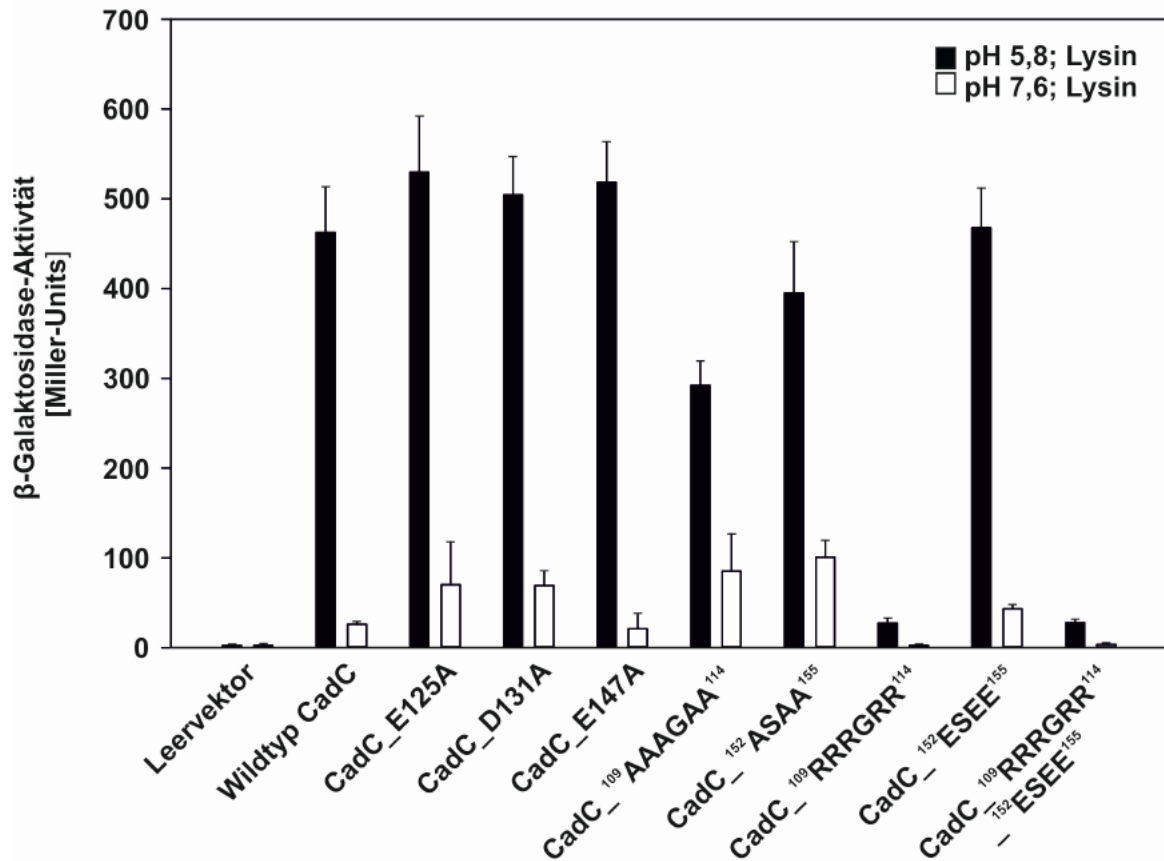
In einem ersten Schritt wurden CadC-Proteine aus der Familie der Enterobakterien mit CadC-Proteinen aus weiteren Familien verglichen. Für die bioinformatische Analyse von CadC wurden CadC-Proteinsequenzen aus *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shewanella piezotolerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fischeri*, *Yersina ruckeri*, *Vibrio vulnificus*, *Serratia odorifera*, *Edwardsiella tarda* und *Vibrio harveyi* mit einer Sequenzhomologieanalyse mittels BLAST (McGinnis & Madden 2004) und CLUSTALW

(Larkin *et al.* 2007) untersucht. Es konnten signifikante Homologien für die DNA-bindende Domäne und die periplasmatische Sensordomäne festgestellt werden, jedoch war die Aminosäuresequenz des Linkers nicht konserviert (Abb. A4) und die Länge der Linkerregionen variierte signifikant (z. B. 51 As in *E. coli*, aber 76 As in *V. fischeri*). Um Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter) zu identifizieren, wurde CadC zusätzlich einer Sekundärstrukturvorhersage mit Hilfe von PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000) unterzogen. Während die DNA-bindende Domäne, die TM-Domäne und die Sensordomäne von CadC stets von strukturgebenden Elementen geprägt waren, konnte die Unstrukturiertheit der Linkerregion als mögliches verbindendes Element bestimmt werden. Demgemäß könnte die Reizweiterleitung im Zytoplasma eher durch strukturelle Eigenschaften des Linkers in CadC als durch sequentielle Eigenschaften beeinflussen werden. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass Proteindomänen oft durch unstrukturierte Linker verbunden sind. Linkerregionen halten den Abstand zwischen der signalaufnehmenden und der signalverarbeitenden Domäne konstant und bieten Raum zur Rotation der Proteindomänen (Liu & Huang 2014).

### 5.1.2 Aminosäuresubstitutionen in der CadC-Linkerregion

#### 5.1.2.1 Gerichtete Mutagenese in der CadC-Linkerregion

Zur Identifikation von Aminosäuren des zytoplasmatischen CadC-Linkers, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind, wurde *cadC* einer gerichteten Mutagenese-Studie unterzogen. Im Rahmen dieser Analyse wurden konservierte geladene Aminosäurereste in CadC gerichtet gegen Alanin, Glutamat und Arginin ausgetauscht. Für die Charakterisierung der CadC-Varianten wurde der *E. coli lacZ*-Reporterstamm EP314 mit den korrespondierenden Plasmiden transformiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Zellen, welche in KE-Minimalmedium (Epstein & Kim 1971) unter induzierenden und nicht induzierenden Bedingungen kultiviert wurden, bestimmt (vgl. 4.5.10.2). Das Plasmid pET16b-*cadC* kodierte für ein funktionelles CadC und diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle diente EP314\_pET16b. Die *cadBA*-Expression von WT-CadC wurde bei pH 5,8 und Anwesenheit von 10 mM Lysin induziert. Es erfolgte keine Aktivierung des *cadBA*-Operons unter nicht induzierenden Bedingungen (Abb. 7). In dem Stamm mit dem Leerplasmid (EP314/pET16b-Negativkontrolle) kam es unter keiner der getesteten Bedingungen zu einer Aktivierung der *cadBA*-Expression (Abb. 7).



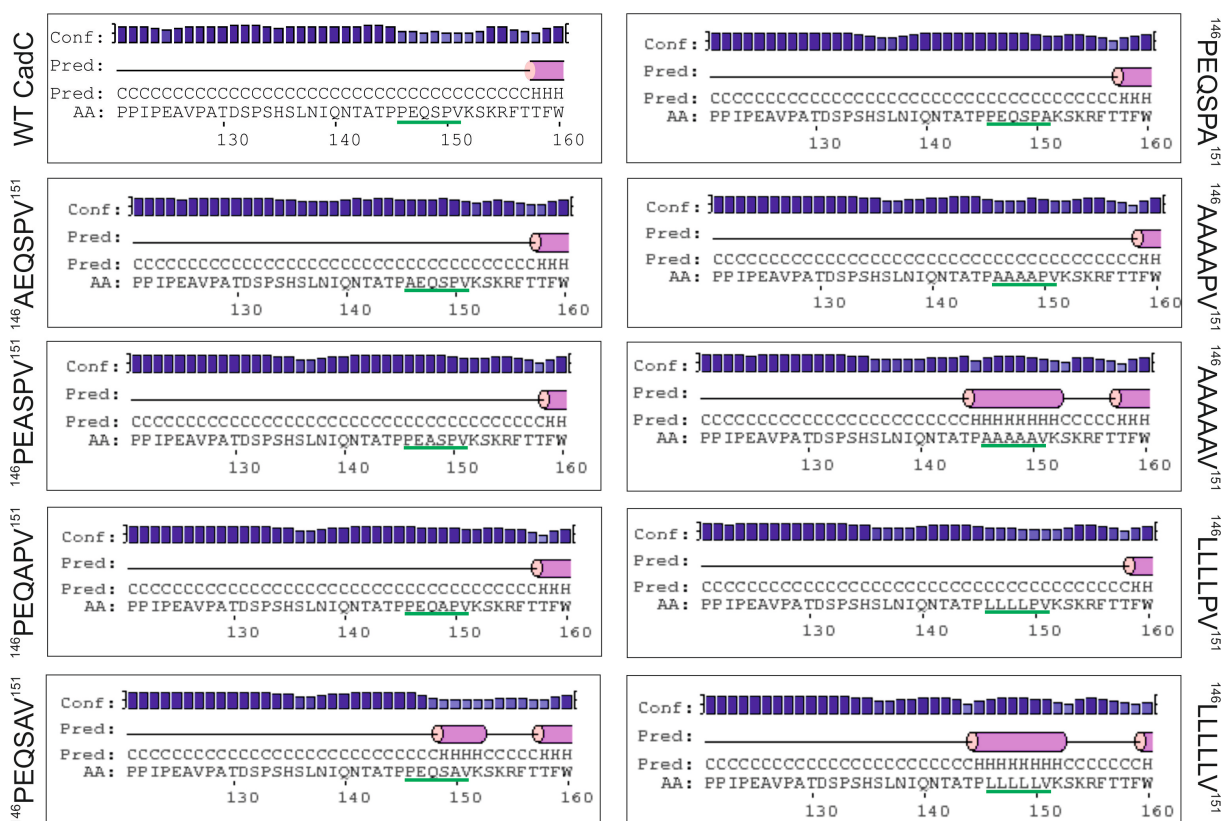
**Abb. 7: Einfluss der Aminosäuresubstitutionen in CadC auf die Expression des *cadBA*-Operons in Abhängigkeit des pH-Wertes.** Quantifizierung der *cadBA*-Transkription in *E. coli* EP314 unter Verwendung des Reportergens *lacZ*. Die Zellen wurden in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und pH 7,6 unter Zugabe von 10 mM Lysin bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente ausgewertet.

Zunächst lag der Fokus auf den Aminosäuren E125, D131, E147 und den zwei Clustern <sup>109</sup>EEEGEE<sup>114</sup> und <sup>152</sup>KSKR<sup>155</sup>. Sowohl Wildtyp CadC als auch die Varianten CadC\_E125A, CadC\_D131A und CadC\_E147A aktivierten die *cadBA*-Expression bei moderater Ansäuerung des Mediums und der Anwesenheit von Lysin (Abb. 7). Die mittleren  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen unter induzierenden Bedingungen bei 462 ( $\pm$  50) Miller Units für WT-CadC, 529 ( $\pm$  62) Miller Units für CadC\_D125A, 504 ( $\pm$  412) Miller Units für CadC\_E131A, bzw. 518 ( $\pm$  45) Miller Units für CadC\_147A. Ebenso führte die Verkürzung der Seitenkette der Varianten CadC<sub>109</sub>AAAGAA<sub>114</sub> und CadC<sub>152</sub>ASAA<sub>155</sub> oder die Substitution von CadC<sub>152</sub>KSKR<sub>155</sub> zu CadC<sub>152</sub>ESEE<sub>155</sub> zu keinen Auswirkungen auf die *cadBA*-Expression (Abb. 7). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eher die Struktur des zytoplasmatischen Linkers als die Anwesenheit spezifischer Aminosäuren die Funktionalität von CadC beeinflussen. Wurde ein positiv geladenes Aminosäurecluster (CadC-<sup>109</sup>RRRARR<sup>114</sup>) inseriert oder erfolgte eine Invertierung der geladenen Cluster (CadC-

<sup>109</sup>RRRARR<sup>114</sup> \_ <sup>152</sup>ESEE<sup>155</sup>), so wurde keine Induktion des *cadBA*-Operons erzielt (Abb. 7). Konformationsänderungen in diesen CadC-Varianten könnten in vivo die Bindung an die DNA verhindern. Alle CadC-Varianten wurden wie Wildtyp-CadC produziert und in die Membran integriert (Daten nicht gezeigt).

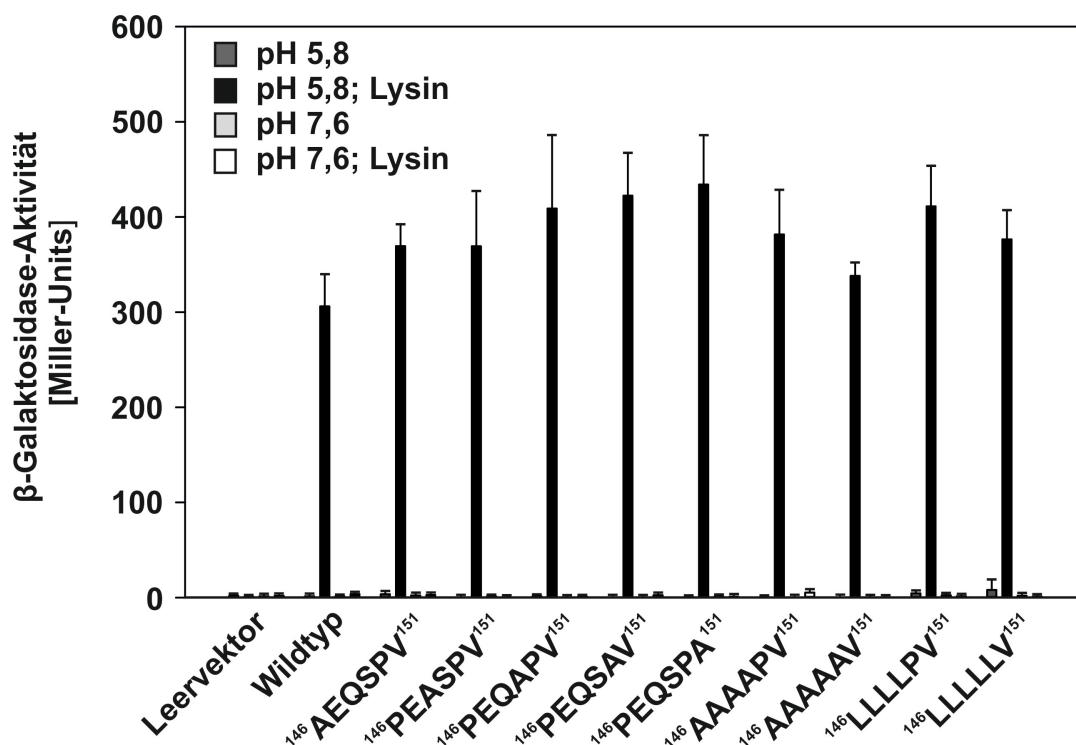
### 5.1.2.2 Untersuchungen zur Bildung einer transienten Helix im CadC-Linker

Sekundärstrukturanalysen mittels PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000) haben einen Bereich im CadC-Linker offenbart, der sich durch niedrige Konfidenz (engl. *confidence*) für ein strukturgebendes Element auszeichnet (<sup>146</sup>PEQSPV<sup>151</sup>). Die Präsenz des Motivs in anderen Proteinen wurde mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (McGinnis & Madden 2004) analysiert. In manchen Proteinen, z. B. in NspA (*neisserial surface protein A*), ist diese Sequenz Teil von Strukturelementen. Konformationsänderungen nach Reizwahrnehmung könnten die Bildung einer geordneten Struktur im CadC-Linker forcieren.



**Abb. 8: Computergestützte Sekundärstrukturanalyse von CadC und CadC-Varianten mittels PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000).** Zu sehen ist die Aminosäuresequenz (Aminosäure 121-160) in CadC. In grün wurde das mutierte Motiv <sup>146</sup>PEQSPV<sup>151</sup> markiert. H:  $\alpha$ -Helix und C: Coil; Konfidenz der Aminosäuren wird als blauer Balken dargestellt.

Die Änderung von einem ungeordneten zu einem geordneten Zustand eines Proteins wurde auch für den Rezeptor ACTR (*activator for thyroid hormone retinoid receptors*) in Eukaryoten beschrieben. In ACTR findet die spontane Ausbildung von drei  $\alpha$ -Helices nach Komplexbildung mit einer weiteren Domäne statt (Kjaergaard *et al.* 2011). Die computergestützte Analyse der Auswirkungen der Substitutionen auf die Sekundärstruktur von CadC mittels PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000) zeigte, dass die Substitutionen  $^{146}\text{PEQSAV}^{151}$ ,  $^{146}\text{AAAAAV}^{151}$  und  $^{146}\text{LLLLLV}^{151}$  im virtuellen Modell zur Bildung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur führten (Abb. 8).



**Abb. 9:** Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im Motiv  $^{146}\text{PEQSPV}^{151}$  auf die *cadBA*-Expression in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Verfügbarkeit von Lysin. Quantifizierung der *cadBA*-Transkription in *E. coli* EP314 unter Verwendung des Reportergens *lacZ*. Die Zellen wurden in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und pH 7,6 - wenn angegeben unter Zugabe von 10 mM Lysin - bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde eine Alanin-Mutagenese-Studie von  $^{146}\text{PEQSPV}^{151}$  durchgeführt, da Alanin für die Bildung von Helices prädestiniert ist (Padmanabhan *et al.* 1990). Die Effekte wurden in vivo mit Hilfe des Reporterstammes *E. coli* EP314 im  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-

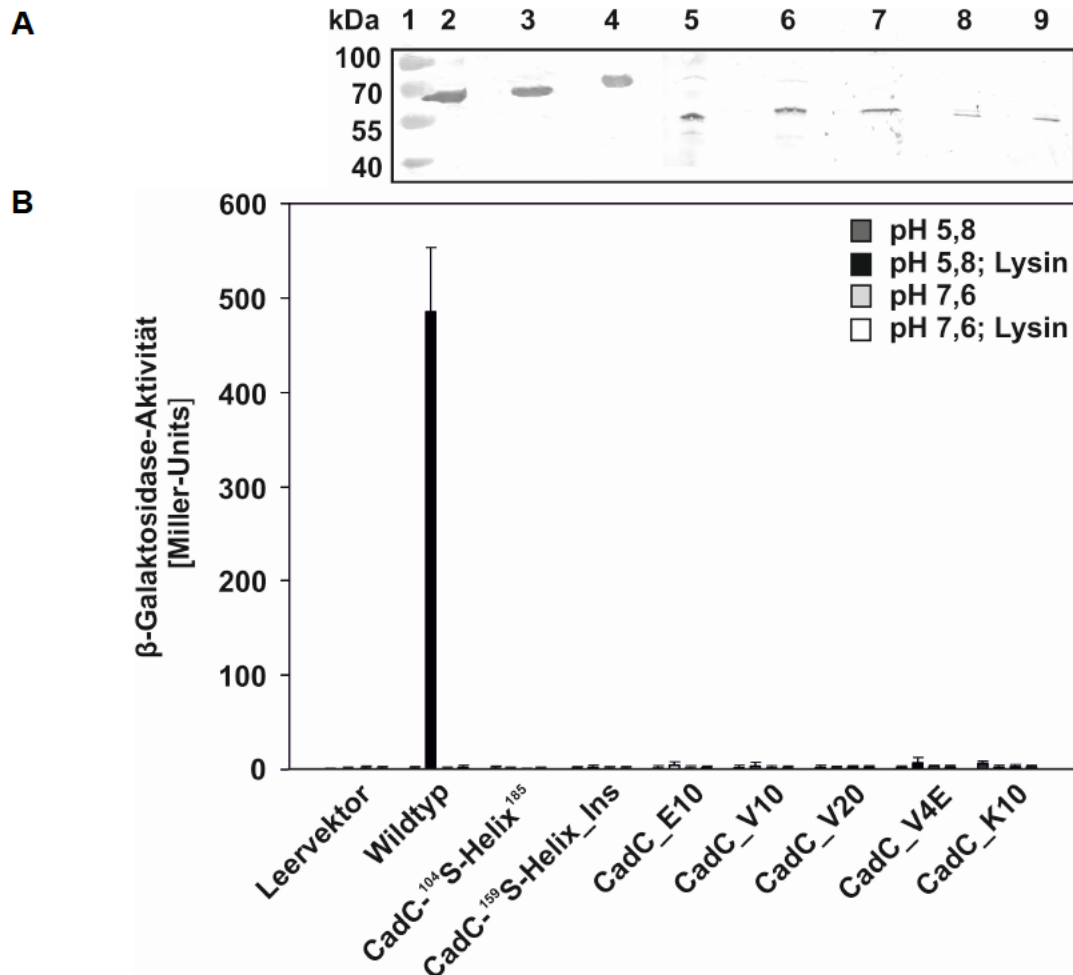
Test analysiert. Die CadC-Varianten CadC-<sup>146</sup>AEQSPV<sup>151</sup>, CadC-<sup>146</sup>PEASPV<sup>151</sup>, CadC-<sup>146</sup>PEQAPV<sup>151</sup>, CadC-<sup>146</sup>PEQSAV<sup>151</sup>, CadC-<sup>146</sup>PEQSPA<sup>151</sup>, CadC-<sup>146</sup>AAAAPV<sup>151</sup>, CadC-<sup>146</sup>AAAAAV<sup>151</sup>, CadC-<sup>146</sup>LLLLPV<sup>151</sup> und CadC-<sup>146</sup>LLLLLV<sup>151</sup> induzierten die *cadBA*-Expression wie WT-CadC mit mittleren  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von ca. 400 ( $\pm$  40) Miller-Units (Abb. 9). Da die Insertion von  $\alpha$ -helikalen Strukturen keinen Einfluss auf die Aktivität des *cadBA*-Operons hervorrief, wird die Annahme eines flexiblen Linkers, der den Abstand zwischen Zytoplasmamembran und DNA-Bindedomäne konstant hält, weiter unterstützt.

### 5.1.2.3 Charakterisierung von CadC-Hybridproteinen

Sekundärstrukturvorhersagen deuten auf keine strukturgebenden  $\alpha$ -helikalen Elemente oder  $\beta$ -Faltblätter hin (vgl. 5.1.1). Nach Wahrnehmung des Reizes im Periplasma wird die Signaltransduktionskaskade aktiviert. Im Zytoplasma besteht die Möglichkeit, dass der CadC-Linker als flexibles Element oder auch als starres Glied zwischen der DNA-bindenden Domäne und der Transmembrandomäne fungieren kann. Um die Auswirkungen von Rigidität, bzw. Flexibilität auf die Aktivität von CadC zu untersuchen, wurden CadC-Hybridproteine aus bekannten Proteinstrukturen konstruiert. Als rigides Element wurde die S-Helix (*signaling helix*) aus NarX gewählt, einem Nitratsensor in *E. coli*. In NarX überlappen HAMP-Domäne und S-Helix, daher wurden für die Konstruktion der Hybridproteine Bereiche gewählt, die diese Region vollständig abdecken. Es wurden Hybridproteine mit vollständigem Austausch des zytoplasmatischen Linkers gegen die S-Helix (und HAMP-Domäne) von NarX (CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>) und Hybridproteine mit Insertion der S-Helix zwischen dem zytoplasmatischen Linker und der Transmembranhelix (CadC-<sup>159</sup>S-Helix\_Ins) erstellt.

Um die Auswirkung von Flexibilität auf die Aktivität von CadC zu überprüfen, wurden in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Stefan Schiller, Universität Freiburg, CadC-Elastin-Hybrid-Proteine generiert. Zum Austausch wurde das Motiv VPGVG aus Elastin-ähnlichen Polypeptiden (ELP) ausgewählt, da dies die häufigste Sequenz im menschlichen Tropoelastin darstellt und sich durch besondere Flexibilität auszeichnet (Daamen *et al.* 2007). Außerdem wurde der CadC-Linker gegen zehn Wiederholungen der Motive VPGEV (CadC\_E10), VPGVG (CadC\_V10) oder VPGKG (CadC\_K10) ersetzt, so dass die native Länge des Linkers nicht erheblich beeinflusst wurde. Zusätzlich wurde ein Konstrukt mit je fünf Wiederholungen aus sowohl VPGVG als auch VPGEV (CadC\_V4E) konstruiert. Des Weiteren wurde ein Konstrukt mit 20 Wiederholungen des Motivs VPGVG (CadC\_V20)

kloniert, bei welchem ein deutlich längerer ELP-Linker inseriert wurde. CadC\_V10 und CadC\_V20 zeichnen sich durch einen hydrophoberen Charakter als CadC\_K10 oder CadC\_V4E aus. CadC\_E10 weist ebenso wie CadC\_K10 ein stärkeres Ladungsverhältnis als der native CadC-Linker auf. Die Substitution des Linkers gegen repetitive Einheiten ist aufgrund ihrer Flexibilität vielversprechend.



**Abb. 10: CadC\_Hybrid-Varianten reprimieren die *cadBA*-Expression.** **A**, Nachweis der Lokalisation von His<sub>10</sub>-CadC-Varianten mittels Immunodetektion. Detektion nach Überproduktion in BL21(DE3)pLysS mittels Penta-His Antikörper in der Membranfraktion. Es wurden pro Spur 25 µg Gesamtprotein aufgetragen. **Spur 1:** Standard; **Spur 2:** WT-CadC; **Spur 3:** CadC-<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>; **Spur 4:** CadC-<sup>159</sup>S-Helix\_Ins; **Spur 5:** CadC\_E10; **Spur 6:** CadC\_V10; **Spur 7:** CadC\_V20; **Spur 8:** CadC\_V4E; **Spur 9:** CadC\_K10. **B**, Quantifizierung der *cadBA*-Transkription in *E. coli* EP314 unter Verwendung des Reportergens *lacZ*. Die Zellen wurden in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und pH 7,6 - wenn angegeben unter Zugabe von 10 mM Lysin - bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die β-Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt. Die β-Galaktosidase-Aktivität stellt ein indirektes Maß für die *cadBA*-Transkription dar. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.



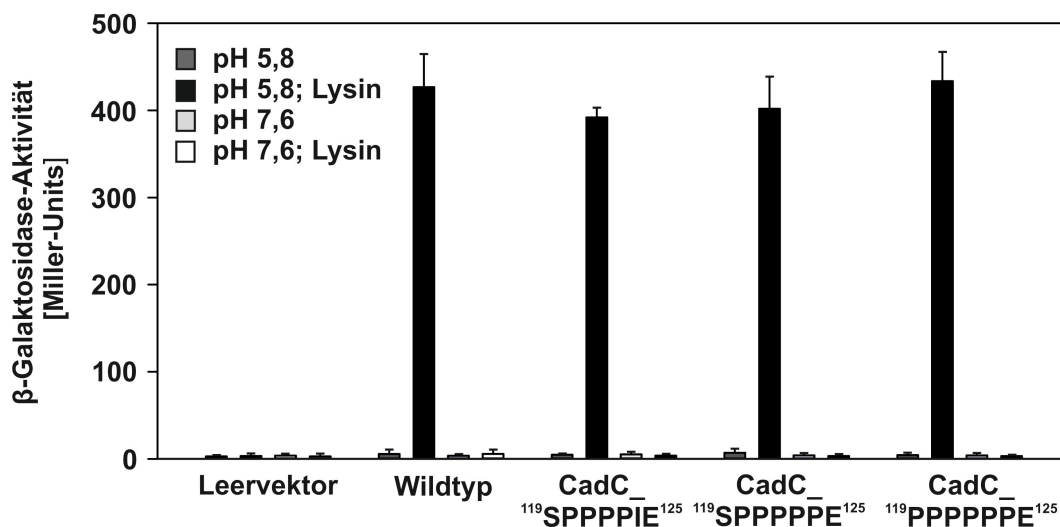
Die Charakterisierung aller CadC-Hybrid-Proteine erfolgte mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung im *lacZ*-Reporterstamm *E. coli* EP314. Die Zellen wurden dafür in Phosphat-gepuffertem KE-Minimalmedium (Epstein & Kim 1971) mikroaerob bei pH 5,8 bzw. 7,6 bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase bei 37°C kultiviert (vgl. 4.3.1). Die Insertion einer S-Helix in die Linkerregion von CadC resultierte in einem inaktiven CadC-Protein (Abb. 10 B). Dabei war es unerheblich, ob der Linker vollständig substituiert wurde (CadC<sup>104</sup>S-Helix<sup>185</sup>) oder die S-Helix zusätzlich zum Linker (CadC<sup>159</sup>S-Helix\_Ins) inseriert wurde. Ebenso konnten alle CadC-Varianten mit Insertionen von flexiblen ELP-Elementen die *cadBA*-Expression nicht induzieren (Abb. 10 B). Es konnten weder Variationen in der Länge des eingebrachten synthetischen Linkers noch in dessen Hydrophobizität eine Aktivierung des *cadBA*-Operons bewirken. In einem weiteren Experiment wurden die CadC-ELP-Varianten im Reporterstamm *E. coli* EP314 bei 30°C kultiviert, da es sich in früheren Arbeiten zeigte, dass ELP temperaturabhängigen Konformationsänderungen unterliegt (Urry *et al.* 1984). Es erfolgte jedoch auch bei Kultivierung der Zellen bei 30°C keine Aktivierung der *cadBA*-Expression (Daten nicht gezeigt). Alle CadC\_S-Helix-Varianten und CadC\_Elastin-Varianten wurden produziert und in die Membran integriert (Abb. 10 A).

#### 5.1.2.4 Einfluss von Polyprolin-Helices und Peptidyl-Prolyl-Isomerasen

Der Elongationsfaktor EF-P verbessert die Translation von Proteinen, welche Cluster aus Prolinresten enthalten, und hat eine bedeutende Rolle in der Feinabstimmung der Expressionsrate bei der Stressantwort von CadC (Ude 2013). Ein konserviertes Prolincluster (<sup>121</sup>PPPIP<sup>124</sup>) wurde im Linker von CadC gefunden. Proteine, welche Motive aus Wiederholungen der Aminosäure Prolin enthalten, können eine rigide Polyprolin-Helix formieren. Eine Polyprolin-Helix kann sowohl als cis-Isomer (Polyprolin-Helix I) als auch als trans-Isomer (Polyprolin-Helix II) auftreten, wobei die linksdrehende Polyprolin-Helix II (PPII) energetisch favorisiert wird (Adzhubei *et al.* 2013). Besonders in unstrukturierten Bereichen von Proteinen sind häufig PPII-Helices lokalisiert, da PPII-Helices sich trotz ihrer Rigidität durch eine größere strukturelle Flexibilität als  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter auszeichnen (Liu & Huang 2014). Neben ihrer strukturellen Funktion haben PPII-Helices auch eine Rolle in der Signaltransduktion (Adzhubei *et al.* 2013). Durch Insertion zusätzlicher Prolinreste wurde das native Prolincluster in CadC vergrößert und der Einfluss auf die Proteinaktivität überprüft. Es wurden CadC-Varianten mit vier, fünf und sechs sich wiederholenden Prolinresten konstruiert (CadC-<sup>119</sup>SPPPIE<sup>125</sup>, CadC-<sup>119</sup>SPPPPPE<sup>125</sup> und



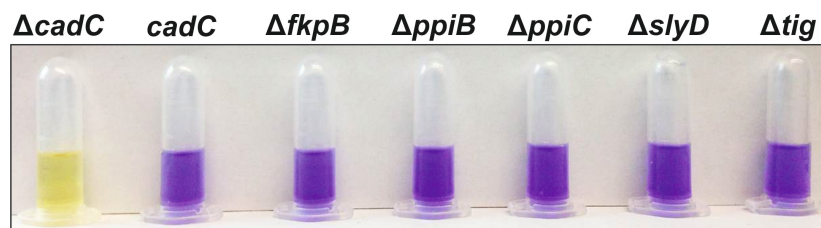
CadC-<sup>119</sup>PPPPPE<sup>125</sup>) und auf ihre Fähigkeit  $P_{cadBA}$  zu aktivieren, analysiert. Hierfür wurde erneut der *E. coli* Reporterstamm EP314 verwendet. Alle CadC-Varianten mit Insertionen zusätzlicher Prolinreste (CadC-<sup>119</sup>SPPPPPE<sup>125</sup>, CadC-<sup>119</sup>SPPPPPE<sup>125</sup> und CadC-<sup>119</sup>PPPPPE<sup>125</sup>) hatten keinen Effekt auf die *cadBA*-Expression und induzierten die *cadBA*-Expression bei pH 5,8 und Anwesenheit von Lysin (Abb. 11). Die mittleren  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen bei ca. 400 ( $\pm$  50) Miller-Units. Die erhöhte strukturelle Rigidität des Linkers nach der Insertion von zusätzlichen Prolinresten hatte keinen Einfluss auf die Signaltransduktion in CadC.



**Abb. 11: Einfluss von repetitiven Prolinresten auf die *cadBA*-Expression.** Quantifizierung der *cadBA*-Transkription in *E. coli* EP314 unter Verwendung des Reportergens *lacZ*. Die Zellen wurden in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und pH 7,6 unter Zugabe von 10 mM Lysin bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die cis-trans-Isomerisierung zwischen den Polyprolin-Helices I und II wird durch Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) katalysiert (Lin *et al.* 1988). Im Zytoplasma von *E. coli* konnten mittels computergestützter Datenbankanalysen ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org)) fünf Isomerasen identifiziert werden (FkpB, PpiB, PpiC, SlyD und Tig). SlyD und FkpB zeichnen sich neben ihrer Funktion als PPIasen auch als Chaperone aus (Knappe *et al.* 2007; Quistgaard *et al.* 2012). Besonders Triggerfaktor Tig ist ein unerlässliches Chaperon bei der Faltung von Proteinen im Zytoplasma und besteht aus drei Domänen, wovon eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität zeigt (Stoller *et al.* 1996). Die CadA-Aktivität der *E. coli* Stämme

BW25113, JW4094 ( $\Delta cadC$ ), JW0026 ( $\Delta fkpB$ ), JW0514 ( $\Delta ppiB$ ), JW3748 ( $\Delta ppiC$ ), JW3311 ( $\Delta slyD$ ) und MC4100 $\Delta tig$  wurde mit Hilfe eines CadA-Schnelltests im Lysindecaboxylase-Medium überprüft (Punkt 4.3.3). Hierbei wurde die Funktionalität von CadC mittels eines Farbumschlags von gelb zu violett nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde *E. coli* BW25113 verwendet, als Negativkontrolle JW4094 ( $\Delta cadC$ ). Die *E. coli* Stämme JW0026 ( $\Delta fkpB$ ), JW0514 ( $\Delta ppiB$ ), JW3748 ( $\Delta ppiC$ ), JW3311 ( $\Delta slyD$ ) und MC4100 $\Delta tig$  zeigten einen Farbumschlag von gelb nach violett (Abb. 12). Die getesteten PPIasen waren für die Funktionalität des Cad-Systems nicht erforderlich.

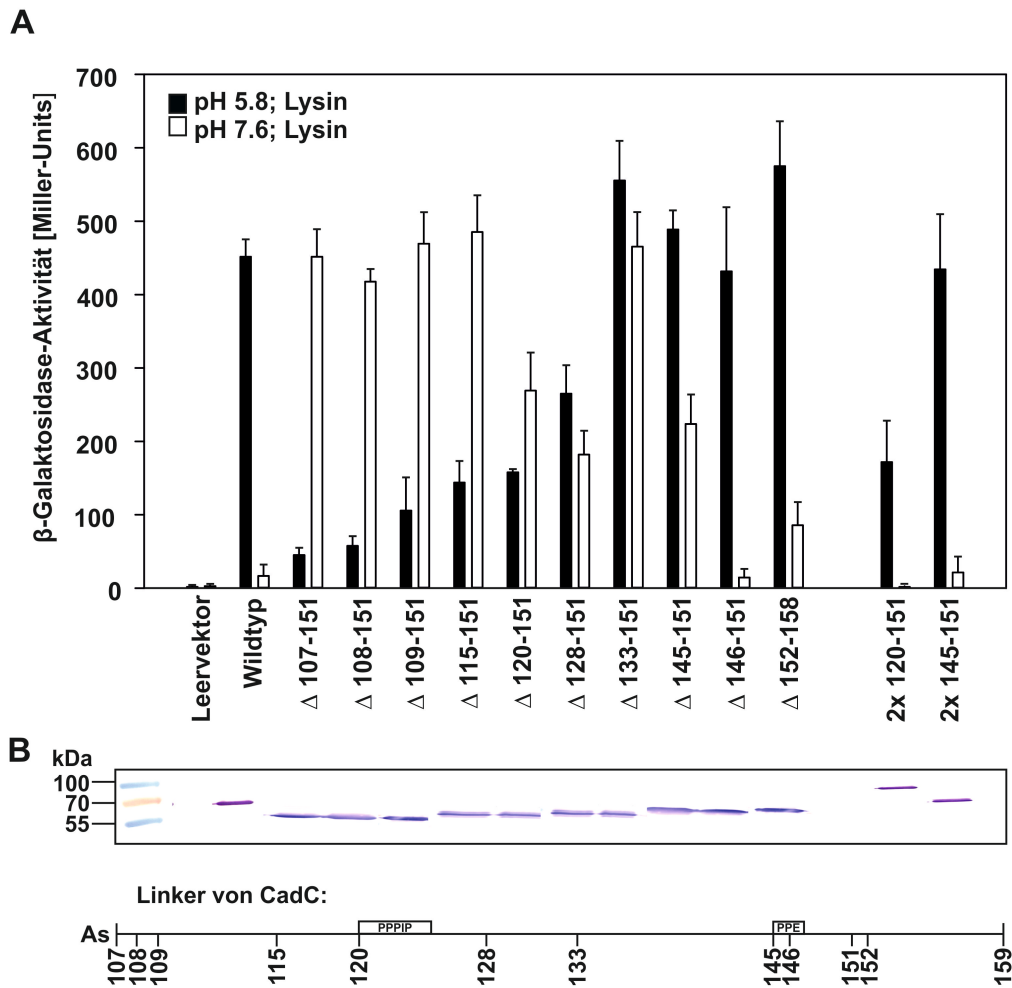


**Abb. 12: Deletion von Peptidyl-Prolyl-Isomerasen im Lysindecaboxylase-Assay.** Die Kulturen wurden in Lysindecaboxylase-Medium über Nacht anaerob bei 37°C kultiviert und der Farbumschlag dokumentiert. Von links nach rechts: Negativkontrolle ( $\Delta cadC$ ), Positivkontrolle (BW25113), JW0026 ( $\Delta fkpB$ ), JW0514 ( $\Delta ppiB$ ), JW3748 ( $\Delta ppiC$ ), JW3311 ( $\Delta slyD$ ) und MC4100 $\Delta tig$ .

### 5.1.3 Variation der Linkerlänge in *E. coli* CadC

Vorausgegangene Beobachtungen implizieren, dass der CadC-Linker eine Vielzahl von Aminosäuresubstitutionen toleriert. Daher wurden anschließend CadC-Varianten mit verkürzter oder verlängerter Linkerregion generiert (Abb. 13). Hierzu wurde *E. coli* EP314 mit den *cadC*-Varianten transformiert und die Zellen in Phosphat-gepuffertem Minimalmedium (Epstein & Kim 1971) kultiviert. Alle verkürzten und verlängerten CadC-Varianten wurden wie Wildtyp-CadC produziert und in die Membran integriert (Abb. 13 B). Zunächst wurden zwei verlängerte CadC-Varianten (CadC\_2x120-151 und CadC\_2x145-151) untersucht, welche die *cadBA*-Expression unter induzierenden Bedingungen aktivierten (Abb. 13 A). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen bei 172 ( $\pm$  50) Miller-Units, bzw. 434 ( $\pm$  74) Miller-Units.

Die Verkürzung des zytoplasmatischen Linkers resultierte in diversen Phänotypen. Wurden nur wenige Aminosäuren des Linkers deletiert (CadC $\Delta$ 145-151, CadC $\Delta$ 146-151 und CadC $\Delta$ 152-158), so hatte dies keinen Einfluss auf das *cadBA*-Operon (Abb. 13 A). Diese Aminosäuren waren entbehrlich für die Funktionalität des CadC-Linkers.



**Abb. 13: Sukzessive Verkürzung und Verlängerung der CadC-Linkerregion.** A, Quantifizierung der *cadBA*-Transkription in *E. coli* EP314 unter Verwendung des Reportergens *lacZ*. Die Zellen wurden bei den angegebenen Bedingungen, mikroaerob bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt ein indirektes Maß für die *cadBA*-Transkription dar. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten. B, Nachweis der Lokalisation von His<sub>10</sub>-CadC-Varianten mittels Immunodetektion. Detektion nach Überproduktion in BL21(DE3)pLysS mittels Penta-His Antikörper in der Membranfraktion. Es wurden pro Spur 25  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen. C, Schematische Präsentation der zytoplasmatischen Linkerregion in CadC. Die Zahlen zeigen die Aminosäurepositionen und die korrespondierende Verkürzung bzw. Verlängerung in CadC an. Zusätzlich wurden zwei Polyprolinmotive markiert.

Jedoch induzierten CadC-Varianten mit Verkürzung von großen Bereichen des Linkers (CadC $\Delta$ 120-151, CadC $\Delta$ 128-151 und CadC $\Delta$ 133-151) die *cadBA*-Expression unabhängig vom externen pH-Wert (Abb. 13 A). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lag bei pH 5,8 bzw. pH 7,6 und Anwesenheit von Lysin bei 158 ( $\pm$  3) bzw. 269 ( $\pm$  51) Miller Units für CadC $\Delta$ 120-

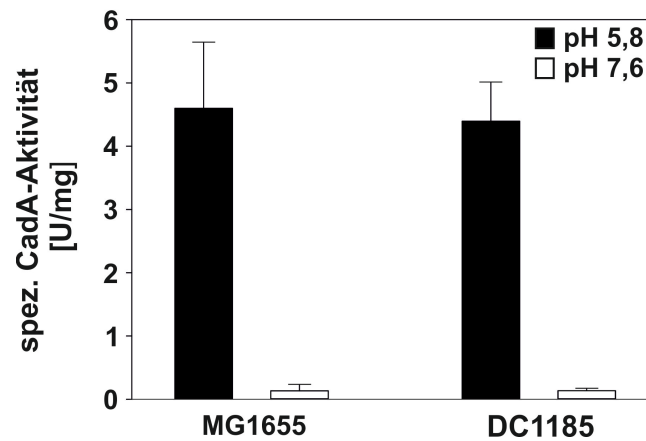
151, bei 265 ( $\pm 37$ ) bzw. 181 ( $\pm 31$ ) Miller Units für CadC $\Delta$ 128-151 und bei 555 ( $\pm 52$ ) bzw. 465 ( $\pm 45$ ) Miller Units für CadC $\Delta$ 133-151. Die Beobachtung ließ den Schluss zu, dass diese Verkürzungen CadC in eine Konformation zwingen, welche zu einem unabhängig vom pH-Stimulus aktiven Zustand führte.

Die CadC-Varianten CadC $\Delta$ 107-151, CadC $\Delta$ 108-151, CadC $\Delta$ 109-151 und CadC $\Delta$ 115-151 führten zu einer pH-deregulierten *cadBA*-Expression (Abb. 13 A).  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden bei pH 7,6 in Anwesenheit von Lysin gemessen, jedoch nicht bei pH 5,8. Die Aktivitäten bei pH 7,6 lagen für CadC $\Delta$ 107-151 bei 452 ( $\pm 36$ ) Miller Units, für CadC $\Delta$ 108-151 bei 417 ( $\pm 16$ ) Miller Units, für CadC $\Delta$ 109-151 bei 469 ( $\pm 41$ ) Miller Units und für CadC $\Delta$ 115-151 bei 485 ( $\pm 49$ ) Miller Units (Abb. 13 A). Demzufolge war die *cadBA*-Expression für CadC $\Delta$ 107-151, CadC $\Delta$ 108-151, CadC $\Delta$ 109-151 und CadC $\Delta$ 115-151 bei pH-Wert 7,6 und der Anwesenheit von Lysin zu beobachten, während keine Aktivierung des *cadBA*-Operons bei pH 5,8 und der Anwesenheit von Lysin stattfand.

#### 5.1.4 Posttranslationale Modifikation von CadC

Die Acetylierung von Lysinresten ist ein dynamischer, reversibler posttranslati onaler Modifikationsmechanismus in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen. Oftmals sind Transkriptionsregulatoren und unstrukturierte Regionen von diesem Mechanismus betroffen (Uversky 2015; Zhang *et al.* 2009). In *E. coli* CadC befinden sich insgesamt fünf Lysinreste in der DNA-Bindedomäne (K59, K77, K80, K95 und K99) und zwei Lysinreste sind im zytoplasmatischen Linker (K152 und K154) lokalisiert. Im Stamm *E. coli* DC1185 liegen Mutationen in den für den Acetatmetabolismus wichtigen Genen *pta* und *ack* vor, welche für die Phosphatacetyltransferase und die Acetatkinase kodieren (Chang *et al.* 1994). Eine Charakterisierung von *E. coli* DC1185 wurde über die Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität aus zellfreien Extrakten als Maß für die Expression des *cadBA*-Operons erzielt. Als Positivkontrolle diente der *E. coli* Stamm MG1655. Hierzu wurden die Zellen in LB-Komplexmedium bei pH 5,8 und pH 7,6 bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase kultiviert, anschließend wurden Proben entnommen und die spezifische CadA-Aktivität wie unter 4.5.11 beschrieben bestimmt. Nur unter induzierenden Bedingungen konnte CadA-Aktivität gemessen werden, diese lag für den Stamm *E. coli* MG1655 bei  $4,6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ . Wurde *E. coli* DC1185 bei pH 7,6 kultiviert, wurde keine CadA-Aktivität gemessen. Erfolgte die Kultivierung bei pH 5,8 so wurde die *cadBA* Expression induziert

(Abb. 14). Die spezifische CadA-Aktivität lag für *E. coli* DC1185 bei pH 5,8 bei  $4,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ , bei pH 7,6 betrug die spezifische Aktivität  $0,14 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ . Acetylierung als posttranslationale Modifikation von CadC konnte in diesem Experiment nicht detektiert werden.

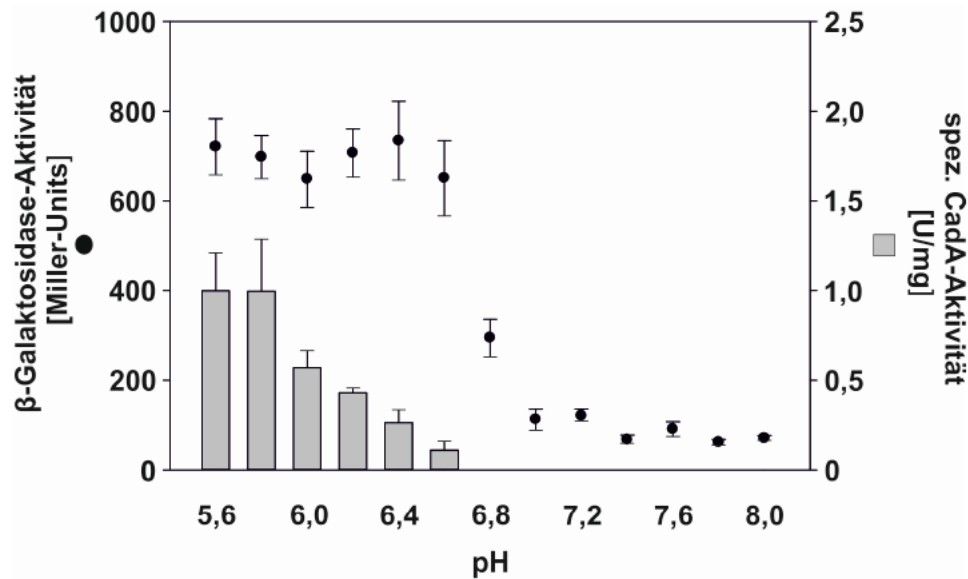


**Abb. 14: Spezifische CadA-Aktivität in *E. coli* MG1655 und *E. coli* DC1185 in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen.** *E. coli* MG1655 und DC1185 wurden in LB-Komplexmedium mikroaerob bei pH 5,8 und pH 7,6 bis zu Beginn der stationären Phase kultiviert und anschließend die spezifische CadA-Aktivität als Maß für die *cadBA*-Expression bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

### 5.1.5 Homodimerisierung von CadC

In früheren experimentellen Befunden deutete vieles darauf hin, dass die Homooligomerisierung von CadC/CadC eine Rolle für die Transkriptionsaktivierung von *cadBA* spielt (Rauschmeier 2014). Die Kristallstruktur der periplasmatischen Domäne von CadC konnte als Homodimer gelöst werden. Die Interaktion wird über eine polare Grenzfläche zwischen zwei CadC-Monomeren und die Protonierung von negativ geladenen Aminosäureresten vermittelt (Eichinger *et al.* 2011; Haneburger *et al.* 2011). Außerdem sind zwei CadC-Bindestellen Cad1 und Cad2 im *cadBA*-Promotor experimentell bestätigt worden. Um die Rolle des Linkers in der Positionierung der DNA-Bindedomänen zu untersuchen, wurde die Fähigkeit zur Homodimerisierung von CadC/CadC bei unterschiedlichen äußeren Bedingungen *in vivo* mit dem Bacterial-Adenylatzyklase-*Two-Hybrid*-System (BACTH) untersucht. Dazu wurden die N-terminalen Hybride T18-CadC (*cadC* im Vektor pUT18C) und T25-CadC (*cadC* im Vektor pkt25) verwendet (Rauschmeier *et al.* 2014). Wenn sich die T18- und T25-Fragmente aufgrund von Interaktion der zu untersuchenden Proteine in

unmittelbarer Nähe zueinander befinden, kann  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Interaktionsstärke der Proteine gemessen werden. Dazu wurden die Zellen im *E. coli* Stamm BTH101 ( $\Delta cyA$ ) mikroaerob bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (Punkt 4.5.10.2). Als Positivkontrolle für die Komplementation dienten die Hybridproteine T25-zip und T18-zip (2000 Miller Units).



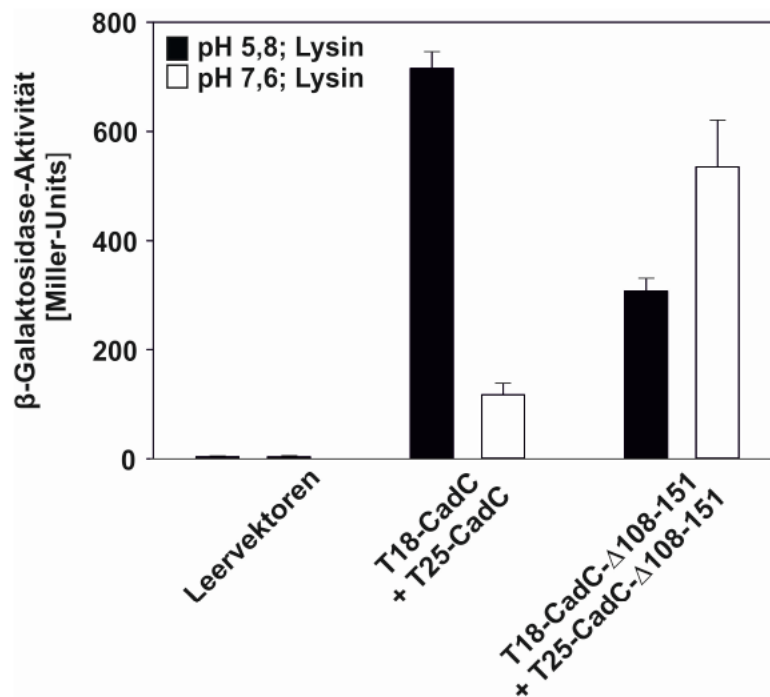
**Abb. 15: pH-abhängige Oligomerisierung von CadC/CadC (●) und pH-abhängige Aktivierung der *cadBA*-Transkription (■).** Eine in vivo BACTH-Analyse wurde zur Identifikation der Interaktion von T18-CadC und T25-CadC verwendet. Die Zellen wurden mikroaerob bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 30°C in KE-Minimalmedium bei pH 5,6-8,0 unter Zugabe von 100 mM Lysin und 0,5 mM IPTG kultiviert. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Interaktion von CadC/CadC bestimmt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die CadC-vermittelte Aktivierung der *cadBA*-Transkription wurde aus einer früheren Arbeit übernommen (Fritz *et al.* 2009).

Starke Interaktion zwischen T18-CadC und T25-CadC konnte unter *cadBA* induzierenden Bedingungen (pH 5,6; 5,8; 6,0; 6,2; 6,4 und 6,6) [721 ( $\pm$  62) Miller-Units, 698 ( $\pm$  47) Miller Units, 648 ( $\pm$  61) Miller Units, 707 ( $\pm$  53) Miller Units, 737 ( $\pm$  87) Miller Units und 651 ( $\pm$  83) Miller Units] festgestellt werden (Abb. 15). Die CadC Monomere waren in unmittelbarer Nähe zueinander. Keine Interaktion von CadC-Proteinen konnte bei neutralen pH-Werten (pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 und 8,0) beobachtet werden (Abb. 15). Die Interaktion von zip-T18 und T25-zip wurde nicht durch den externen pH-Wert beeinflusst (Rauschmeier *et al.* 2014). Die CadC-vermittelte Aktivierung der *cadBA*-Transkription in Abhängigkeit vom externen

pH wurde in einer früheren Arbeit beschrieben (Fritz *et al.* 2009). Dazu wurde die intrinsische CadA-Aktivität des *E. coli* Stammes MG1655, als Maß für die Transkriptionsaktivierung durch CadC, bestimmt. Das Cad-System wurde unter neutralen bzw. leicht alkalischen Bedingungen, auch bei Vorhandensein von Lysin, nicht aktiviert (Abb. 15). Unter induzierenden Bedingungen (Anwesenheit von Lysin und mikroaerophile Bedingungen) war bereits bei pH 6,8 CadA-Aktivität messbar (Abb. 15). Bei Abwesenheit von Lysin wurde die Expression des *cadBA*-Operons auch bei niedrigem externen pH nicht induziert (Daten nicht gezeigt). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im BACTH-System und die Produktion von CadA zeigten Abhängigkeit vom externen pH-Wert. Beide Aktivitäten nahmen bei pH-Werten  $> 6,8$  zu (Abb. 15) und Homodimerisierung von CadC fand ausschließlich bei induzierenden Bedingungen statt.

Des Weiteren wurde die Fähigkeit zur Homodimerisierung von CadC- $\Delta 108-151$  bei pH 5,8 und 7,6 mittels in vivo BACTH-Analyse untersucht. CadC- $\Delta 108-151$  induzierte die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bei pH 7,6 und führte zu keiner *cadBA*-Transkription unter induzierenden Bedingungen (vgl. 5.1.3). Zur Charakterisierung der Interaktion von CadC- $\Delta 108-151$ /CadC- $\Delta 108-151$  wurden die Hybridproteine T18-CadC- $\Delta 108-151$  und T25-CadC- $\Delta 108-151$  konstruiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wie unter 4.5.10.2 beschrieben bestimmt. T18-CadC und T25-CadC interagierten unter induzierenden Bedingungen [879 ( $\pm$  64) Miller Units], keine Interaktion war bei neutralem pH-Wert messbar (Abb. 16). T18-CadC- $\Delta 108-151$  und T25-CadC- $\Delta 108-151$  interagierten deutlich stärker bei pH 7,6 [811 ( $\pm$  55) Miller Units], als bei pH 5,8 [404 ( $\pm$  51) Miller Units] (Abb. 16). Die Homodimerisierung von CadC- $\Delta 108-151$  fand, anderes als die Homodimerisierung von WT-CadC, unter nicht induzierenden Bedingungen statt (Abb. 16) und CadC- $\Delta 108-151$  wies im Vergleich zu WT-CadC ein invertiertes Interaktionsprofil auf.





**Abb. 16: pH-abhängige Oligomerisierung von CadC-Δ108-151/CadC-Δ108-151.** Eine *in vivo* BACTH-Analyse wurde zur Identifikation der Interaktion von T18-CadC-Δ108-151 und T25-CadC-Δ108-151 verwendet. Die Zellen wurden mikroaerob bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 30°C in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und 7,6 unter Zugabe von 100 mM Lysin und 0,5 mM IPTG kultiviert. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde nach Miller (1972) als Maß für die Interaktion von T18-CadC-Δ108-151 und T25-CadC-Δ108-151 bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

## 5.2 Die Struktur der zytoplasmatischen Domäne von CadC

Die Struktur von CadC ist noch nicht vollständig gelöst. Da es sich als einfacher erwiesen hat, Kristalle einzelner Proteindomänen zu erhalten, wurde bisher nur die Kristallstruktur der periplasmatischen Sensordomäne von CadC (As 188-512) mittels 3D-Kristallisation mit 1,8 Å aufgeklärt (Eichinger *et al.* 2011; Haneburger *et al.* 2011). Zur Struktur der zytoplasmatischen Effektoromäne in CadC ist bisher wenig bekannt. Sekundärstrukturvorhersagen mittels PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000) identifizieren den Bereich von Aminosäure 1-103 als DNA-bindende Domäne, die Linkerregion von Aminosäure 104-159 zeigt keine Sekundärstrukturelemente. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur der zytoplasmatischen Domäne von CadC gelöst werden und die Dynamik der Linkerregion untersucht werden. Zusätzlich sollen Informationen zum Faltungszustand der zytoplasmatischen Domäne nach DNA-Bindung bereitgestellt werden. Die Röntgenstrukturaufklärung erfolgt über die Analyse eines charakteristischen Beugungsmusters von Röntgenstrahlen, da im Proteinkristall atomare

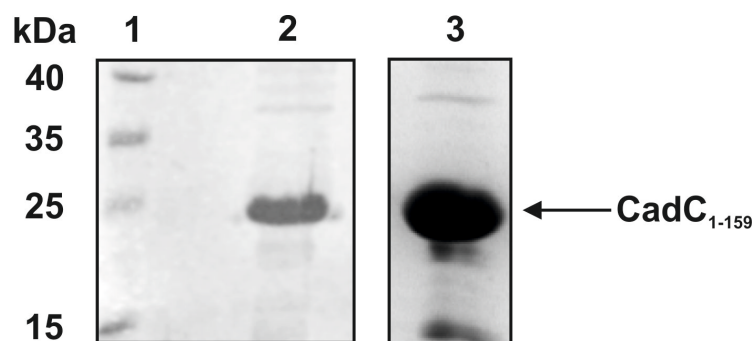


Bausteine in dreidimensionaler periodischer Weise angeordnet sind. Des Weiteren sollte in einem zweiten parallelen Ansatz die Strukturaufklärung des DNA-Bindemotivs in CadC mit Hilfe der Kernspinresonanz-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance* - NMR-Spektroskopie) erfolgen. Die NMR-Spektroskopie erlaubt die Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und der Wechselwirkungen mit den Nachbaratomen (Kwan *et al.* 2011). Die Methode beruht auf dem Phänomen der magnetischen Kernresonanz. Die Proteinprobe befindet sich dazu in einem starken Magnetfeld und die Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment der Atomkerne der Probe und des magnetischen Wechselfelds kann gemessen werden. Proteine sind keine starren Gebilde, sondern können innerhalb gewisser Grenzen dynamische Bewegungen vollziehen (Vranken 2014). Die Dynamik von Proteinen wird vor allem mit Hilfe der Lösungs-NMR-Spektroskopie untersucht, da nur in Lösung ein quasi-natives, d.h. dynamisches Bild des Proteins vorliegt, während Kristallstrukturen eine Momentaufnahme des Proteins repräsentieren. Die NMR-Messungen wurden von Dr. Andreas Schlundt am Lehrstuhl für biomolekulare Spektroskopie am Department Chemie der Technischen Universität München durchgeführt und die Röntgenstrukturaufklärung erfolgte durch Dr. Andreas Schlundt und Dr. Robert Janowski am deutschen Elektronen-Synchrotron DESY der Helmholtz-Gemeinschaft in Hamburg.

### 5.2.1 Reinigung löslicher CadC-Varianten

Für die Versuche zur Strukturaufklärung wurden CadC-Varianten der DNA-Bindedomäne (CadC<sub>1-103</sub>, CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-114</sub>) und die Variante CadC<sub>1-159</sub> (enthält die DNA-Bindedomäne und den Linker) verwendet. Da sowohl für die Röntgenkristallographie als auch für die NMR-Spektroskopie eine sehr reine, hochkonzentrierte Proteinlösung benötigt wird, wurden Affinitätschromatographie-Reinigungsstudien wie unter 4.5.2 beschrieben mit löslichen zytoplasmatischen CadC-Varianten durchgeführt (Tab. 5). Die Reinigung des Konstrukts CadC<sub>1-103</sub> ergab eine vergleichsweise geringe Proteinausbeute von ca. 60 µM Protein. Um auszuschließen, dass im Konstrukt CadC<sub>1-103</sub> Bereiche der DNA-bindenden Domäne separiert wurden, wurden die Varianten CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-114</sub> gereinigt. Für CadC<sub>1-107</sub> konnte eine Endkonzentration der Proteinlösung von 250 µM erzielt werden (BL21(DE3)pLysS\_pET16b-basierendem Expressionssystem). Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000) die DNA-bindende Domäne von CadC in nicht ausreichender Länge vorhersagt. Die Reinigung für CadC<sub>1-114</sub> im

BL21(DE3)pLysS\_pET16b-basierendem Expressionssystem ergab geringere Proteinmengen als für CadC<sub>1-107</sub> (Tab. 5). Daher wurden Folgeexperimente mit dem Konstrukt CadC<sub>1-107</sub> durchgeführt. Die Proteinkonzentration von CadC<sub>1-159</sub> (BL21(DE3)pLysS\_pET16b-basierendem Expressionssystem) betrug nach der Reinigung 200  $\mu$ M, die Reinheit des eluierten Proteins lag bei  $\sim 95\%$  (Abb. 17, Spur 2, Tab. 5). Da die Proteinmenge von 200  $\mu$ M für zweidimensionale NMR-Messungen ausreichte, erfolgten diese Versuche nach Expression von CadC<sub>1-159</sub> im BL21(DE3)pLysS\_pET16b-basierendem Expressionssystem. Um die CadC-Proteinmengen für dreidimensionale NMR-Messungen weiter zu steigern, wurden CadC<sub>1-159</sub>-MBP-Fusionsproteine und CadC<sub>1-159</sub>-Trx-Fusionsproteine generiert (Tab. 5). Die Proteinausbeute von CadC<sub>1-159</sub> nach Überproduktion im Expressionssystem BL21(DE3)pLysS\_pMalC2-*cadC*<sub>1-159</sub>, BL21(DE3)pLysS\_pT*cadC*<sub>1-159</sub>\_MalE oder BL21(DE3)pLysS\_pET32a-*cadC*<sub>1-159</sub> erwies sich als gering (Tab. 5). Zusätzlich wurden CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> im Plasmidsystem pETM11 exprimiert (Proteinmengen über 200  $\mu$ M), da der His-Tag vor CadC auf diese Weise mittels der TEV-Protease effizient abgespalten werden kann. Anschließend wurden die Plasmide pETTrx1a-*cadC*<sub>1-107</sub> und pETTrx1a-*cadC*<sub>1-159</sub> konstruiert, da die Gruppe von Prof. Dr. Sattler in früheren Experimenten hohe Proteinausbeuten im Expressionssystem BL21(DE3)pLysS\_pETTrx1a erzielte und ebenfalls eine Abspaltung des His-Tags von CadC mittels TEV-Protease möglich ist. Die Reinigung von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> im Expressionssystem BL21(DE3)pLysS\_pETTrx1a erzielte Proteinmengen von 2 mM für CadC<sub>1-107</sub> und 800  $\mu$ M für CadC<sub>1-159</sub> (Abb. 17, Spur 3; Tab. 5).



**Abb. 17: SDS-Gel nach Reinigung von CadC<sub>1-159</sub> über Affinitätschromatographie und Gelfiltration.** CadC<sub>1-159</sub> wurde mit Hilfe von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration wie unter 4.5.2.3 beschrieben gereinigt und ankonzentriert. Gezeigt ist CadC<sub>1-159</sub> nach Kultivierung und Überproduktion in verschiedenen Expressionssystemen. **Spur 1:** Standard; **Spur 2:** CadC<sub>1-159</sub> (pET16b-basierendem Expressionssystem), 200  $\mu$ M; **Spur 3:** CadC<sub>1-159</sub> (pETTrx1a-basierendem Expressionssystem), 800  $\mu$ M

Sowohl die Röntgenkristallographie als auch die dreidimensionalen Messungen zur NMR-Strukturaufklärung wurden mit den CadC-Proteinen nach Expression in BL21(DE3)pLysS\_pETTrx1a durchgeführt. Die Reinigung von pETTrx1a\_CadC<sub>1-107</sub> und pETTrx1a\_CadC<sub>1-159</sub> und die Abspaltung des Thioredoxins mit Hilfe der TEV-Protease erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sattler am Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie Department Chemie, Technische Universität München. Um den Reinheitsgrad der Proteinlösung zu steigern, wurde für CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> eine weitere Reinigung über Gelfiltration (Säule: Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) und Ionenaustauschchromatographie (Säule: MonoQ HR 5/5, GE Healthcare) durchgeführt. Proteine mit unterschiedlichen relativen Molekülgrößen können mit dieser Methode getrennt werden. Die relative Molekülgröße von CadC<sub>1-107</sub> beträgt 12,4 kDa, von CadC<sub>1-159</sub> 18,0 kDa.

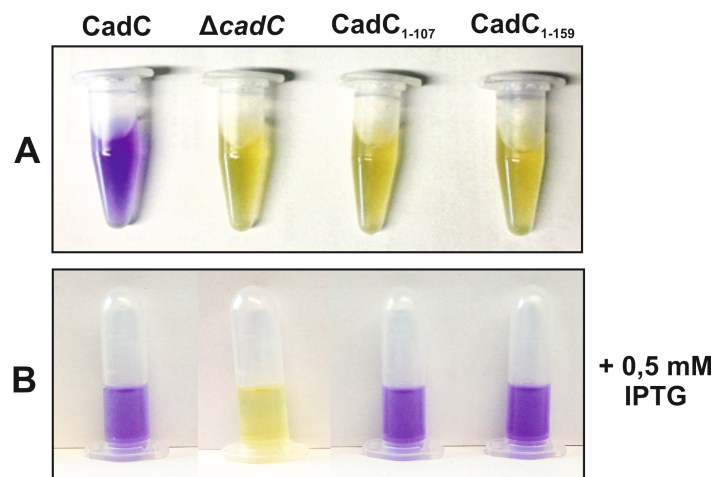
**Tab. 5: Reinigungsstudie mit löslichen CadC-Varianten**

Vektor	Promotor	Tag(s)	Protease	Proteinkonzentration
pET16b_cadC <sub>1-103</sub>	T7/lac	N-His	Faktor Xa	60 µM
pET16b_cadC <sub>1-107</sub>	T7/lac	N-His	Faktor Xa	250 µM
pET16b_cadC <sub>1-114</sub>	T7/lac	N-His	Faktor Xa	76 µM
pET16b_cadC <sub>1-159</sub>	T7/lac	N-His	Faktor Xa	200 µM
pMalC2-cadC <sub>1-159</sub>	tac/lac	N-His N-MBP	Faktor Xa	33 µM
pTcadC <sub>1-159</sub> _MalE	T7/lac	N-His C-MBP	-	10 µM
pET32a_cadC <sub>1-159</sub>	T7/lac	N-His N-TrxA C-His	Thrombin	15 µM
pETM11_cadC <sub>1-107</sub>	T7/lac	N-His	TEV	280 µM
pETM11_cadC <sub>1-159</sub>	T7/lac	N-His	TEV	210 µM
pETTrx1a_cadC <sub>1-107</sub>	T7/lac	N-His N-TrxA	TEV	2 mM
pETTrx1a_cadC <sub>1-159</sub>	T7/lac	N-His N-TrxA	TEV	800 µM

### 5.2.2 Funktionalität löslicher CadC-Varianten

Die Funktionalität der CadC-Varianten CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> wurde mit Hilfe eines CadA-Schnelltests im Lysin-Decarboxylase-Medium (Punkt 4.3.3) überprüft. Hierfür wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ cadC mit den Plasmiden pET16b-cadC, pET16b (Leervektor),

pET16b-cadC<sub>1-107</sub> und pET16b-cadC<sub>1-159</sub> komplementiert. Für CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> konnte kein Farbumschlag detektiert werden, für WT-CadC erfolgte ein Farbumschlag von gelb zu violett (Abb. 18). Die Kopienzahl von CadC im Wildtyp liegt bei 3-5 Molekülen pro Zelle (Ude *et al.* 2013), durch Induktion kann die Kopienzahl von CadC stark erhöht werden. Nach Induktion mit IPTG konnte für CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> ein Farbumschlag von gelb nach violett beobachtet werden (Abb. 18). Für eine Aktivierung des *cadBA*-Operons durch die löslichen Varianten CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> wurden höhere Kopienzahlen benötigt als für WT-CadC.

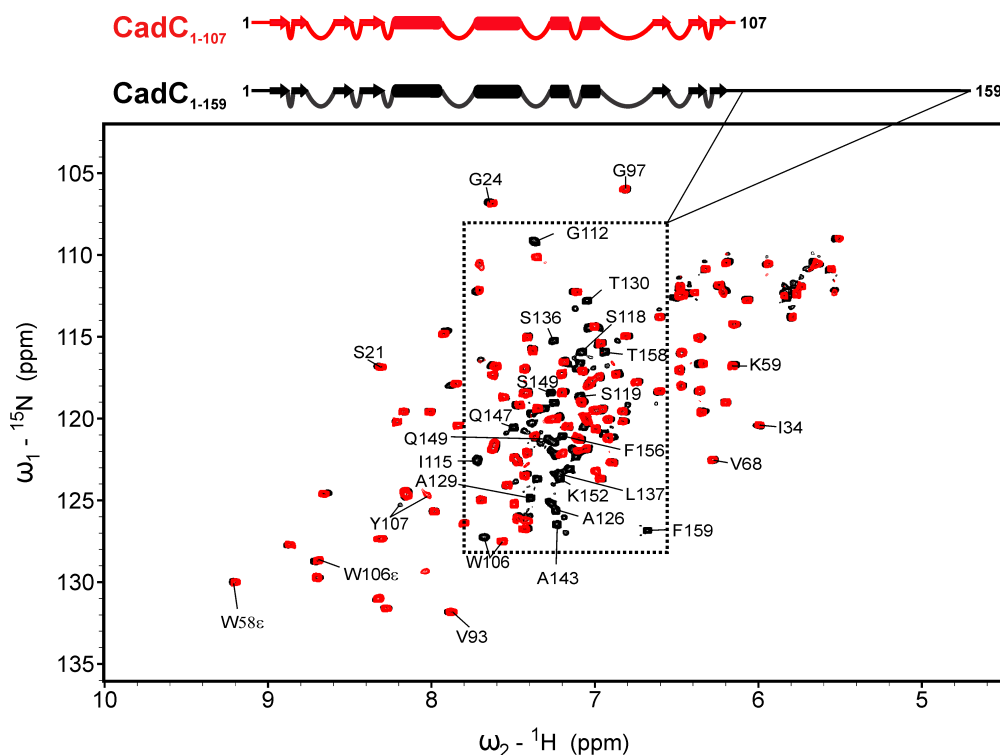


**Abb. 18: Komplementation von BL21(DE3) $\Delta$ cadC durch CadC, CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> im Lysindecaboxylase-Assay.** Die Kulturen wurden in Lysindecaboxylase-Medium über Nacht anaerob bei 37°C kultiviert und der Farbumschlag dokumentiert. Von links nach rechts: CadC, Negativkontrolle ( $\Delta$ cadC), CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub>. **A**, ohne Induktion **B**, nach Induktion mit 0,5 mM IPTG

### 5.2.3 NMR-Spektroskopie der zytoplasmatischen Domäne von CadC

Um die Struktur und Dynamik der zytoplasmatischen Domäne von CadC zu untersuchen, wurden NMR-Spektroskopie-Analysen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sattler am Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie Department Chemie der Technischen Universität München von Dr. Andreas Schlundt durchgeführt. Biomakromoleküle, wie Proteine, sind aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Nuclei aufgebaut. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie kann das Verhalten eines Moleküls auf atomarer Ebene betrachtet werden. Die Markierung, Reinigung und Ankonzentrierung der CadC-Varianten erfolgte wie unter 4.3 und 4.5.2.3 beschrieben. Die NMR-Spektren von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> wurden mit der Software Topspin 3.1 an den Spektrometern Bruker Avance mit 500, 600 und 800 MHz

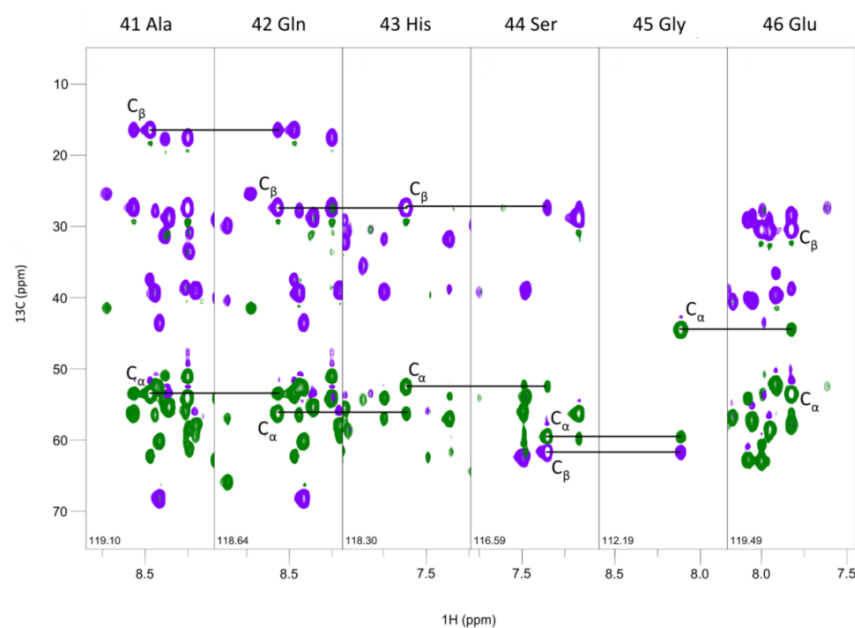
Protonenlarmorfrequenz und einem Cryoprobekopf aufgenommen. Die Resonanzen eines NMR-Spektrums werden als chemische Verschiebung als Faktor p.p.m. (*parts per million*) angegeben. Zunächst wurden zweidimensionale NMR-Spektren von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> aufgenommen. Als zweidimensionale Methode wurde das  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*)-Spektrum ausgewählt, in welchem direkt gebundene  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ - Nuklei korreliert werden (Kwan *et al.* 2011). Jedes Amid des zu untersuchenden Proteins kann in einem HSQC-Spektrum dargestellt werden.



**Abb. 19:  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub>.** Die N-terminale Region von CadC<sub>1-159</sub> weist eine Tertiärstruktur auf, während die C-terminale Region von CadC<sub>1-159</sub> unstrukturiert und in Lösung flexibel ist (markiert in schwarz). CadC<sub>1-107</sub> (markiert in rot) weist eine strukturierte DNA-bindende Domäne auf und zeigt keine unstrukturierte Region. Dargestellt ist zusätzlich eine schematische Abbildung der vorhergesagten Sekundärstruktur von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub>. Pfeile markieren  $\beta$ -Stränge, Zylinder repräsentieren  $\alpha$ -Helices und Linien stellen unstrukturierte Bereiche dar. Die Abbildung wurde durch Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, erstellt.

Das HSQC-Spektrum von CadC<sub>1-107</sub> zeigte eine gefaltete Domäne, dies wurde durch sehr gute Signaldispersion der Resonanzsignale im Spektrum unterstützt (Abb. 19). Da das  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von CadC<sub>1-159</sub> keine großen Unterschiede zu dem  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von CadC<sub>1-107</sub> aufwies, wurde angenommen, dass der zytoplasmatische Linker in CadC keinen

Einfluss auf die Domänenstruktur der DNA-bindenden Domäne von CadC hatte (Abb. 19). Es konnte eine fast vollständige Überlagerung der Resonanzen der Aminosäuren 1-105 in CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> festgestellt werden. Zusätzliche Resonanzen des Linkers von CadC<sub>1-159</sub> sind um die Protonenregion 7,5 bis 8,5 ppm zentriert (schwarze Signale in Abb. 19), Signale in dieser Region weisen auf fehlende Sekundärstrukturelemente hin (Abb. 19). Anschließend wurden NMR-Resonanz-Untersuchungen mit drei markierten Kernen ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) durchgeführt.

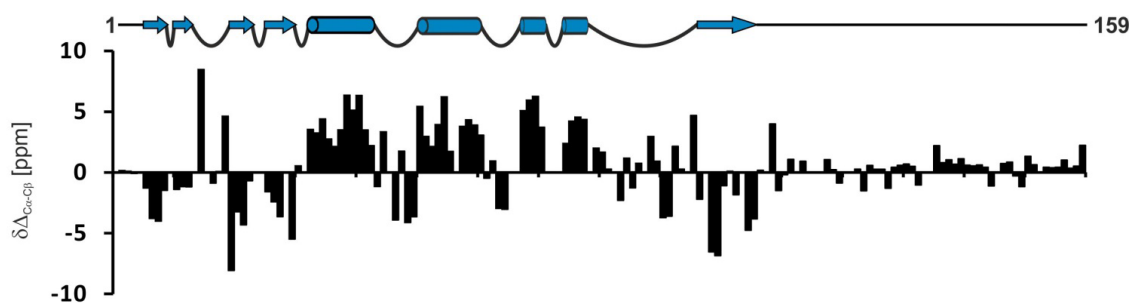


**Abb. 20:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HNCACB-Planes der Aminosäuren 41-46 der DNA-bindenden Domäne von CadC im HNCACB-Spektrum.  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Resonanzen von Ala41 sind schwächer als  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Resonanzen von Gln42.  $\text{C}_\alpha$ -Resonanzen wurden grün gekennzeichnet,  $\text{C}_\beta$ -Resonanzen wurden violett markiert. Die Abbildung wurde durch Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, erstellt.

Die Expression von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> fand in Minimalmedium, welches mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $^{13}\text{C}$ -Glukose versetzt wurde, statt (Punkt 4.3). Die Zuordnung der Aminosäurereste in CadC erfolgte durch Korrelation der Resonanzen benachbarter Reste in einem HNCACB-Spektrum. In einem HNCACB-Spektrum werden, wie im zweidimensionalen  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment, Amidprotonen mit Stickstoffmolekülen korreliert (Gil-Caballero *et al.* 2014). Jedoch wird als dritte Ebene die  $^{13}\text{C}$  chemische Verschiebung der  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Resonanzen eines ausgewählten Aminosäurerestes und des vorhergehenden Aminosäurerestes betrachtet.  $\text{C}_\alpha$ -Kohlenstoffatome zeigen meist stärkere Signale als  $\text{C}_\beta$ -Kohlenstoffatome und die Signale von  $\text{C}_\alpha$ -Kohlenstoffatomen und  $\text{C}_\beta$ -Kohlenstoffatomen desselben Nucleus sind ebenfalls

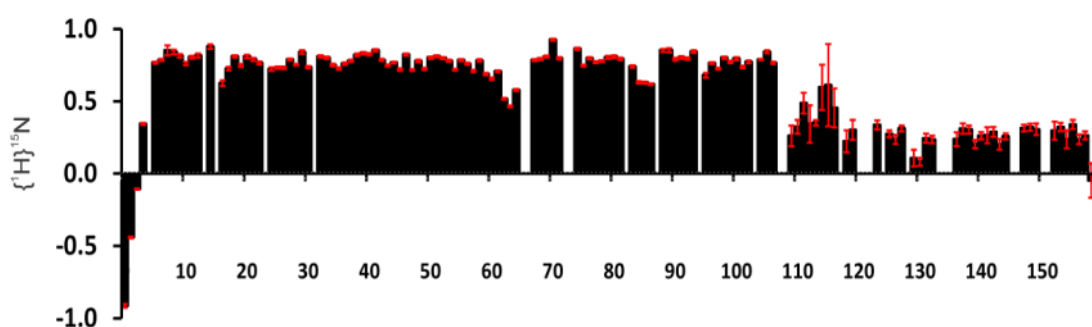
meist stärker als die Signale des benachbarten Nucleus (Gil-Caballero *et al.* 2014). Daher können stärkere Signale für die  $C\alpha$  und  $C\beta$  Resonanzen der gleichen Aminosäure beobachtet werden, als für den unmittelbar folgenden Rest (Abb. 20). Eine Ausnahme bilden Proline, die über keine amidigen Wasserstoffmoleküle verfügen.

Nach Zuordnung der Aminosäurereste mittels des Programms CcpNmr Analysis (Vranken *et al.* 2005) in CadC<sub>1-107</sub> und in CadC<sub>1-159</sub> konnten Sekundärstrukturelemente mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebung analysiert werden (Lindeman & Adama 1971). In diesem Experiment wurde der relative Abstand der Resonanzlinie des zu untersuchenden Proteins zur Resonanzlinie eines Standards untersucht. Der Resonanzlinie des Standards wird die chemische Verschiebung 0 zugewiesen (Wishart & Sykes 1994). Als NMR-Standard dienten die Resonanzlinien von DSS (Natriumsalz der 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure), da DSS hohe Wasserlöslichkeit aufweist und die Resonanzen leicht identifizierbar sind (Wishart & Sykes 1994). Negative Werte der chemischen Verschiebung der zu untersuchenden Aminosäurereste in Relation zu DSS als Standard weisen auf  $\beta$ -Stränge hin, positive Werte weisen auf  $\alpha$ -Helices hin (Wishart & Sykes 1994). Für die Region von As 1-107 konnten fünf  $\beta$ -Stränge (negative Werte) und vier  $\alpha$ -Helices (positive Werte) identifiziert werden (Abb. 21). Die Region von As 108-159 wies keine Sekundärstruktur auf (Abb. 21). Die Sekundärstruktur von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub>, abgeleitet aus der chemischen Verschiebung, zeigte einen  $\beta$ -Strang C-terminal der DNA-Bindedomäne (Abb. 21).



**Abb 21: Die Sekundärstruktur von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> abgeleitet aus der sekundären chemischen Verschiebung.** Zusammensetzung der Sekundärstruktur von CadC<sub>1-159</sub> abgeleitet von der Analyse der kombinierten sekundären chemischen Verschiebungen von  $C\alpha$  und  $C\beta$ . Pfeile markieren  $\beta$ -Stränge, Zylinder repräsentieren  $\alpha$ -Helices und Linien stellen unstrukturierte Bereiche dar. Abfolgen negativer Werte der sekundären chemischen Verschiebung repräsentieren  $\beta$ -Stränge, Abfolgen positiver Werte deuten auf  $\alpha$ -Helices hin. Die Abbildung wurde durch Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, erstellt.

Des Weiteren sollte die Flexibilität von CadC<sub>1-159</sub> untersucht werden. Dazu wurde ein  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  heteronukleares NOE (*Nuclear Overhauser Effect*)-Experiment durchgeführt. Hetero-NOE-Effekte reagieren sensitiv auf die Beweglichkeit von Aminosäureresten. Ist diese Bewegung schneller als die Gesamtbewegung des Proteins, so steigt der Austausch mit gesättigten Protonen und der Wert sinkt unter 0,8. Dies ist der Fall, wenn sich Aminosäurereste außerhalb von Sekundärstrukturen des Proteins befinden. So weisen strukturierte Domänen auf Werte von ca. 0,8 hin, geringere Werte implizieren Flexibilität im Piko- bis Nanosekundenbereich (persönliche Kommunikation Dr. Andreas Schlundt). Letzteres konnte für CadC<sub>108-159</sub> beobachtet werden (Abb. 22). Die N-terminale DNA- Bindedomäne (As 1-107) wies in großen Bereichen keinen Protonenaustausch in diesem Zeitfenster auf (Abb. 22). Jedoch wurde ein Protonenaustausch für die Region zwischen Aminosäure 66-70 vermutet, da ein deutlicher Abfall der Werte zu erkennen ist (Abb. 22). Dies spricht für eine rigide und kompakte Domäne in CadC<sub>1-107</sub>. Am N-Terminus (As 1-3) und am C-Terminus (As 158-159) von CadC konnten negative Werte gemessen werden, diese Werte lagen deutlich unter den Werten von CadC<sub>108-157</sub> (Abb. 22). Interessanterweise zeichnet sich der unstrukturierte Bereich von CadC<sub>108-157</sub> durch eine gewisse Stabilität im Vergleich zu frei beweglichen Aminosäuren am N-Terminus aus.



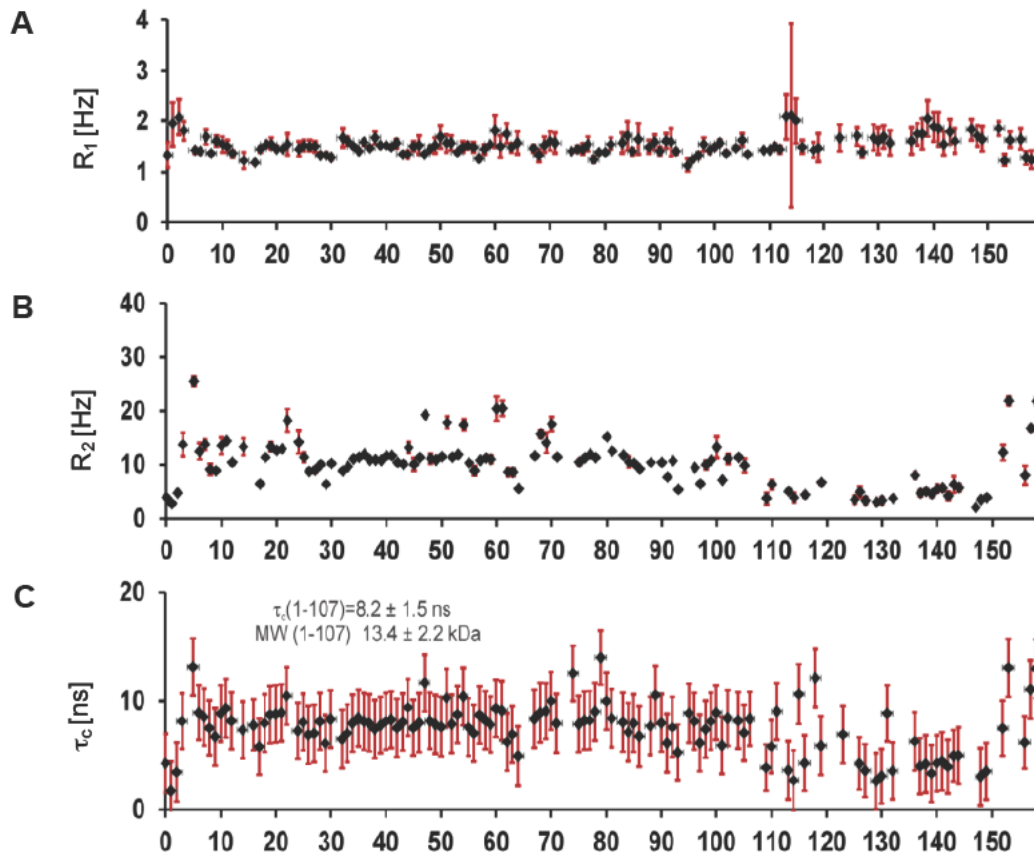
**Abb 22: Die Dynamik von CadC<sub>1-159</sub> im  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  Hetero-NOE-Experiment.** Werte von 0,8 weisen auf Sekundärstrukturelemente hin, geringere Werte deuten auf flexible Regionen hin. Bei der Standardabweichungen (markiert in rot) handelt es sich um eine Fehlerfortsetzung, welche sich auf die Größenabweichungen der Messpunkte bezieht. Die Abbildung wurde durch Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, erstellt.

Um die Flexibilität der Region CadC<sub>108-159</sub> weiter einzugrenzen, wurden  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsraten ( $R_1$  und  $R_2$ ) von CadC<sub>1-159</sub> aufgenommen. Der Vorgang der Relaxation beschreibt das Streben eines Kernspins nach Anregung (Magnetisierung) zurück zum Gleichgewichtszustand und wird als Relaxationszeit angegeben. Die longitudinale Relaxationszeit ( $T_1$ ) bestimmt die Zeit



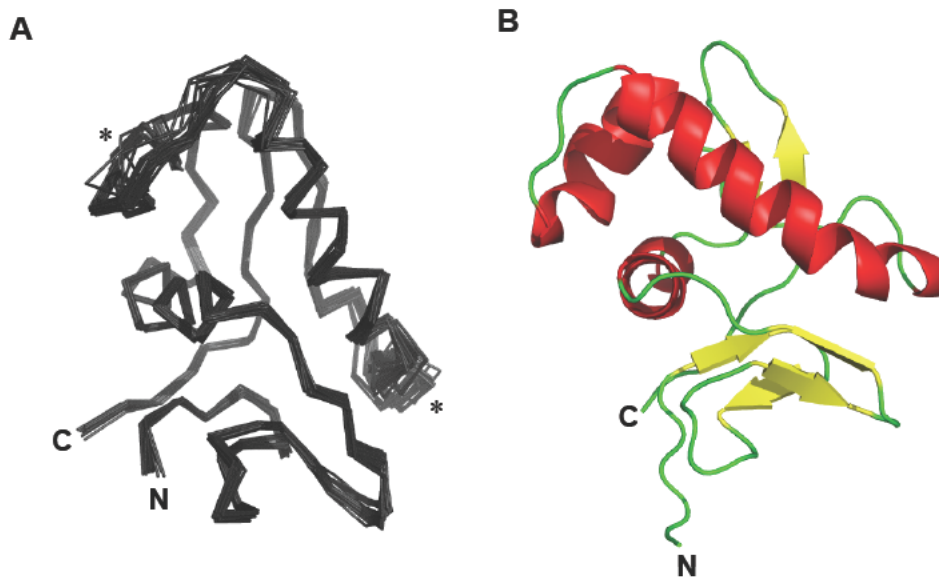
nach Anregung der Probe bis der Gleichgewichtszustand parallel zum äußeren Feld erreicht wird. Die transversale Relaxationszeit ( $T_2$ ) beschreibt den Abbau einer zum magnetischen Feld senkrechten Polarisation bis zum Gleichgewichtswert und gibt die Beweglichkeit der Moleküle in ihrer Umgebung an, dies wird als Relaxationsrate  $R_2$  angegeben. Je stärker die Beweglichkeit der Probe eingeschränkt ist, desto geringer ist  $T_2$  (Bloembergen *et al.* 1948). Große Moleküle, z. B. Proteine, zeigen in Lösung eine geringe Beweglichkeit, dies spiegelt sich in hohen  $T_1$ - und geringen  $T_2$ -Werten wieder (Kay *et al.* 1989). Die Messungen wurden bei 600 MHz  $^1\text{H}$  Larmorfrequenz durchgeführt. Die longitudinalen Relaxationswerte ( $R_1$ ) waren für CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> sehr ähnlich (Abb. 23). Transversale Relaxationswerte ( $R_2$ ) unterlagen in CadC<sub>1-159</sub> Schwankungen (Abb. 23). Die Region CadC<sub>108-159</sub> zeichnete sich durch einen geringeren Grad an transversaler Relaxation aus, die longitudinale Relaxationsrate zeigte geringere Schwankungen (Abb. 23 A und B).

Da die Relaxationszeiten von der Größe eines Moleküls abhängig sind, können Relaxationsexperimente Aufschluss über Größe und Homodimerisierung eines Proteins geben (Kay *et al.* 1989). Zur Größenbestimmung wird die totale Korrelationszeit (*total correlation time*  $\tau_c$ ) aus  $R_1$  und  $R_2$  bestimmt (Farrow *et al.* 1994). Die Kalkulation des Molekulargewichts von CadC<sub>1-107</sub> aus  $\tau_c$  erfolgte mittels einer Protein-Eichgeraden (persönliche Kommunikation Dr. Andreas Schlundt). Allerdings stehen die Relaxationsdaten nur für gefaltete Proteindomänen in direktem Verhältnis zum Molekulargewicht. Daher konnte  $\tau_c$  für CadC<sub>1-107</sub> und nicht für die unstrukturierte Linkerregion in CadC (As 108-158) bestimmt werden (Abb. 23 C). Das kalkulierte Molekulargewicht von CadC<sub>1-107</sub> ( $13,4 \pm 2,2$  kDa) entsprach dem theoretischen Molekulargewicht von 12,4 kDa und CadC<sub>1-107</sub> lag im Relaxationsexperiment in Lösung als Monomer vor. Die totale Korrelationszeit von  $T_1$  und  $T_2$  resultierte in unterschiedlichen Beweglichkeitsmustern von CadC<sub>108-159</sub> im Vergleich zu CadC<sub>1-107</sub>. Für die Aminosäurereste 108-159 des zytoplasmatischen CadC-Linkers ( $\tau_c \sim 5,5$  ns) konnte eine stärkere Rotation verzeichnet werden, als für die Aminosäurereste 1-107 der DNA-bindenden Domäne ( $\tau_c \sim 8,2$  ns) (Abb. 23 C). Diese Beobachtung implizierte, dass der zytoplasmatische Linker in CadC keine Sekundärstruktur aufwies und sich durch geringe Rigidität auszeichnete.



**Abb 23: Relaxationsdaten zur Rigidität von CadC<sub>1-159</sub>.** **A**, Longitudinale <sup>15</sup>N-Relaxationsdaten ( $R_1$ ) von CadC<sub>1-159</sub>. **B**, Transversale <sup>15</sup>N-Relaxationsdaten ( $R_2$ ) von CadC<sub>1-159</sub>. **C**, Total correlation time ( $\tau_c$ ) aus  $R_1$  und  $R_2$  von CadC<sub>1-107</sub> ( $\tau_c$ :  $8,2 \pm 1,5$  ns) basierend auf CadC<sub>1-159</sub>. Das kalkulierte Molekulargewicht von CadC<sub>1-107</sub> betrug  $13,4 \pm 2,2$  kDa. Die Standardabweichung ( $< 2,6$  ns) von  $\tau_c$  beruht auf der Fehlerfortpflanzung der Fitfehler für die Relaxationsraten-Standardabweichungen in  $R_1$  und  $R_2$ . Die Abbildung wurde durch Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, erstellt.

Die Strukturberechnung der DNA-bindenden Domäne von CadC (CadC<sub>1-107</sub>) basierend auf 2021 zugeordneten NOEs erfolgte mit Hilfe der Software CYANA3 (Güntert 2004). Basierend auf NOEs und Winkelinformationen aus der Zuordnung von CadC<sub>1-107</sub> wurden automatisch 100 Strukturen berechnet. Anschließend fand die computergestützte Auswahl der 20 energieärmsten Strukturen von CadC<sub>1-107</sub> statt. Insgesamt wurde der Rechenprozess 15-mal wiederholt, wobei zunehmend NOEs aus sichtbaren Sekundärstrukturen miteinbezogen wurden. Die derzeitige Qualität der Konvergenz der NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub> liegt bei 0,46 backbone RMSD (*root-mean-square deviation*). RMSD gibt den durchschnittlichen Abstand zwischen Atomen an.

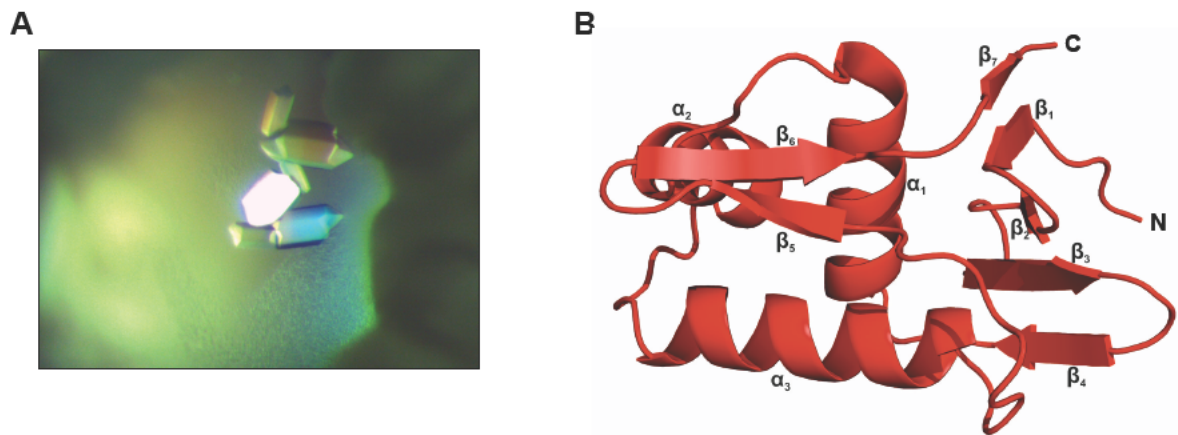


**Abb 24: NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub>.** A, Stereo-Ribbon-Ansicht der NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub>. Gezeigt ist ein Ensemble der 20 energieärmsten Strukturen errechnet durch das Programm Cyana (Güntert 2004) mit den Aminosäuren 4-107. Der Proteinrückgrat-RMSD beträgt 0.46. \* kennzeichnet Bereiche mit geringerer Konvergenz B, Cartoon-Ansicht der energieärmsten Struktur von oben mit farbkodierten Sekundärstrukturelementen (rot:  $\alpha$ -Helix; gelb:  $\beta$ -Strang; grün: unstrukturierte Region). Abgebildet ist die komplette Struktur. Der C-Terminus (C) und der N-Terminus (N) sind gekennzeichnet. Alle Abbildungen wurden mit dem Programm Pymol (DeLano 2002) erstellt. CadC<sub>1-107</sub> wurde mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie wie unter 4.5.2.3 beschrieben gereinigt. Fraktionen der Gelfiltration, bzw. der Ionenaustauschchromatographie wurden vereinigt, auf 800  $\mu$ M Proteinlösung ankonzentriert und für NMR-Messungen verwendet. Insgesamt wurden 2021 zugeordnete NOEs für die Strukturberechnung verwendet. Die NMR-Spektroskopie und die Strukturauswertung wurden am Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie der Technischen Universität München von Dr. Andreas Schlundt durchgeführt.

Die NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub> umfasste ein „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv und N- und C-terminale  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Abb. 24). Für die CadC-Linkerregion in CadC<sub>1-159</sub> konnte aufgrund der Dynamik des Linkers und fehlender Sekundärstrukturelemente keine einheitliche NMR-Struktur festgelegt werden. Die Stereo-Ribbon-Ansicht der NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub> zeigte weniger Konvergenz in den Bereichen um Aminosäure N65 und um Aminosäure D85 in CadC. Diese zwei Bereiche zeichneten sich durch verstärkte Flexibilität im Hetero-NOE-Experiment aus und sind potentiell beweglicher als andere Bereiche der DNA-bindenden Domäne in CadC. Aufgrund der verstärkten Flexibilität könnten diese Bereiche an der DNA-Bindung beteiligt sein.

#### 5.2.4 Röntgenkristallographie der DNA-Bindedomäne von CadC

Die DNA-Bindedomäne von CadC (CadC<sub>1-107</sub>) wurde wie unter 4.5.2.3 beschrieben gereinigt und ankonzentriert. Anschließend wurde die CadC<sub>1-107</sub>-Proteinlösung (25 mg/mL) mit Hilfe des Pipettier-Roboters Mosquito Nanodrop Dispenser (TTP Labtech) an der X-ray Crystallography Plattform des Helmholtz-Zentrum München in 96 Well-Mikrotiterplatten pipettiert und mit verschiedenen Fällungsreagenzien versetzt. Die Platten wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Löslichkeit des Proteins wird herabgesetzt, indem die Konzentration der Fällungsreagenzien höher vorliegt als die eingesetzte Proteinkonzentration. Nach etwa einer Woche entstanden mit 10 mM Zinksulfat; 10 mM MES pH 6,5 und 25% Polyethylenglycol (PEG) 550 Methylmonoether (MME) Kristalle. Um größere Kristalle zu erhalten, wurden die Kristallisationsbedingungen verändert: 10 mM Zinksulfat, 10 mM MES pH 6,5 und 27,5% PEG 550 MME. Zusätzlich fand eine Derivatisierung der Kristalle mit Schwermetall statt  $[(Ta_6Br_{12})^{2+} \cdot 2Br^-]$ . Der Kristall, der am Synchrotron vermessen wurde ist in Abb. 25 A unter dem Mikroskop dargestellt. Die Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> konnte mit einer Auflösung von 2,0 Ångström gelöst werden (Abb. 25 B). Die Messung wurde von Dr. Andreas Schlundt und Dr. Robert Janowski am deutschen Elektronen-Synchrotron DESY der Helmholtz-Gemeinschaft in Hamburg durchgeführt. Die Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> zeigte, wie auch die NMR-Struktur, ein „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv (Abb. 24 und 25), wie es Transkriptionsregulatoren der OmpR-Familie besitzen. In CadC<sub>1-107</sub> werden drei  $\alpha$ -Helices N-terminal von vier antiparallelen  $\beta$ -Strängen und C-terminal von drei antiparallelen  $\beta$ -Strängen flankiert. Der dritte C-terminale  $\beta$ -Strang ( $\beta$ -Strang 7) in CadC<sub>1-107</sub> stellt eine Besonderheit innerhalb der Familie der OmpR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren dar, da die Topologien der OmpR-ähnlichen Regulatoren nur zwei C-terminale  $\beta$ -Stränge aufweisen (Abb. 25).  $\beta$ -Strang 7 ist am Übergang zwischen DNA-bindender Domäne und zytoplasmatischer Linkerregion lokalisiert und könnte aufgrund der exponierten Lage in die Stabilisation bei der DNA-Bindung involviert sein. Wie in PhoB (Blanco *et al.* 2002) wird das Helix-Turn-Helix-Motiv in CadC von den Helices  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  und der dazwischenliegenden  $\alpha$ -Schleife gebildet. Helix  $\alpha 3$  interagiert in PhoB mit der großen Furche der DNA, eine Linkerregion zwischen zwei  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ -Strang 5 und 6) interagiert mit der kleinen Furche der DNA.



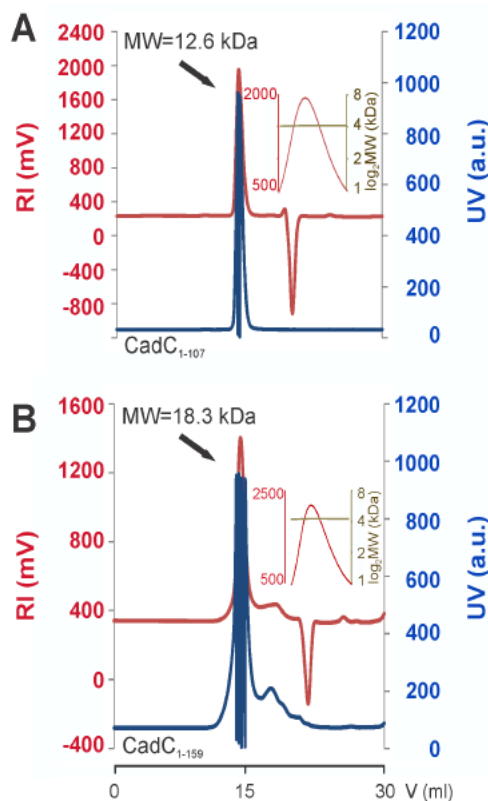
**Abb. 25: Kristallisation von CadC<sub>1-107</sub>.** Die DNA-bindende Domäne von CadC (CadC<sub>1-107</sub>) wurde mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration wie unter 4.5.2 beschrieben gereinigt. Die Messung der Streuung des Kristalls wurde am X-ray Crystallography Plattform des Helmholtz-Zentrums München durchgeführt. **A**, Die Abbildung zeigt einen CadC<sub>1-107</sub>-Kristall unter dem Mikroskop, der Kristall entstand in Gegenwart von 10 mM Zinksulfat; 10 mM MES pH 6,5 und 27,5% PEG 550 MME. **B**; Die Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> konnte mit einer Auflösung von 2,0 Ångström gelöst werden. CadC<sub>1-107</sub> setzt sich aus einem „winged Helix-Turn-Helix“ DNA-Bindemotiv ( $\alpha$ -Helix 1,  $\alpha$ -Helix 2, und  $\alpha$ -Helix 3) und N-terminalen ( $\beta$ -Strang 1,  $\beta$ -Strang 2,  $\beta$ -Strang 3 und  $\beta$ -Strang 4) und C-terminalen  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta$ -Strang 5,  $\beta$ -Strang 6 und  $\beta$ -Strang 7) zusammen. Der C-Terminus (C) und der N-Terminus (N) sind gekennzeichnet. Abbildung 25A wurde am Lehrstuhl für biomolekulare Spektroskopie am Department Chemie der Technischen Universität München von Dr. Andreas Schlundt aufgenommen, Abbildung 25B wurde mit dem Programm Pymol (DeLano 2002) erstellt.

### 5.2.5 CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> liegen als Monomere vor

Unstrukturierte Linker spielen bei der Oligomerisierung und damit bei der Reizweiterleitung eine wichtige Rolle in Prokaryoten (Little *et al.* 2012). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CadC als Homodimer agiert und die Dimerisierung über die periplasmatische Domäne in CadC vermittelt wird (Eichinger *et al.* 2011; Haneburger *et al.* 2011; Lindner & White 2014). Um zu untersuchen, ob die CadC-Linkerregion an der Oligomerisierung der zytoplasmatischen DNA-bindenden Domäne beteiligt ist, wurden *Static Light Scattering* (SLS)-Messungen am Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie der Technischen Universität München von Dr. Andreas Schlundt durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Kalkulation des Molekulargewichts eines Moleküls abhängig von den Eigenschaften der spezifischen Lichtstreuung in Lösung (Zimm 1948). Für CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> konnte



Homogenität der Probe festgestellt werden, da beide Proteine im Gelfiltrationsprofil einen einzelnen UV-Peak aufwiesen (Abb. 26 A und B). Der Brechungsindex zeigte bei einer Konzentration von 5 mg/mL, dass CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> unabhängig von dem Linker in CadC monomerisch vorlagen (Abb. 26 A und B). Das kalkulierte Molekulargewicht mittels der OmniSEC Software (www.malvern.com) von CadC<sub>1-107</sub> (12,6 kDa) und CadC<sub>1-159</sub> (18,3 kDa) entsprach den theoretischen Molekulargewichten (siehe Legende Abb. 26). Es findet unabhängig von der Linkerregion keine Oligomerisierung der zytoplasmatischen Domäne von CadC statt.



**Abb. 26: Untersuchung der Oligomerisierung von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> mittels *Static light scattering*.**

UV-Absorption (blaue Kurve) und Brechungsindex (rote Kurve) im analytischen Gelfiltrationschromatogramm von CadC<sub>1-107</sub> (A, theoretisches Molekulargewicht 12,6 kDa, 5 mg/mL) und CadC<sub>1-159</sub> (B, theoretisches Molekulargewicht 18,3 kDa, 5 mg/mL) mit mittels der OmniSEC Software (www.malvern.com) ermittelten Molekulargewichten. Der Pfeil markiert den Peak und die Kurven zum Molekulargewicht wurden mit einem binärem Logarithmus (log<sub>2</sub>MW) ermittelt. Es wurde eine semi-analytische SD200 Säule mit einem Volumen von 23 mL (GE Healthcare) verwendet. Die Abbildung wurde von Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, angefertigt.

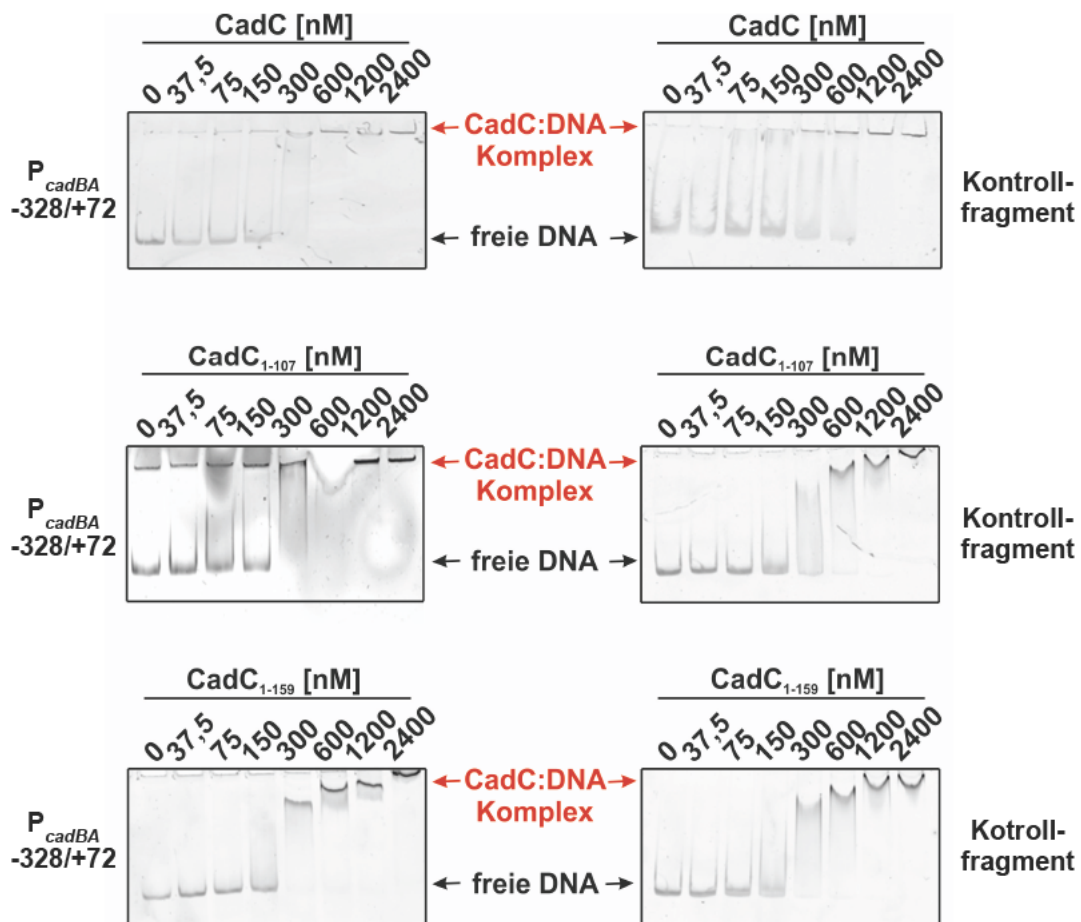
### 5.3 Interaktion von CadC mit der DNA

Die Struktur der DNA-Bindedomäne von CadC konnte mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie gelöst werden (vgl. 5.2.3 und 5.2.4). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde anschließend eine gerichtete Mutagenesestudie des DNA-Bindemotivs von CadC durchgeführt, um Aufschluss über Protein-DNA Interaktionsstellen zu erhalten. Außerdem wurde der Bindemechanismus von CadC an die DNA und die Fähigkeit der verkürzten CadC-Varianten CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> zur Bindung an die DNA untersucht. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Bindung von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> an P<sub>cadBA</sub> mit

Hilfe von Gel-Retardationsexperimenten analysiert (Punkt 4.5.8). Um genauere Aussagen zur Bindekinetik treffen zu können, wurde eine Charakterisierung der CadC<sub>1-107</sub>:P<sub>cadBA</sub>- und CadC<sub>1-159</sub>:P<sub>cadBA</sub>-Interaktion mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Ferner wurden Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Experimente (SPR-*Surface Plasmon Resonance*) durchgeführt (Punkt 4.5.9) und die Kinetik zu CadC<sub>1-107</sub>:P<sub>cadBA</sub>, CadC<sub>1-159</sub>:P<sub>cadBA</sub>, und der Varianten CadC<sub>1-107</sub>\_E30R:P<sub>cadBA</sub> und CadC<sub>1-107</sub>\_R96A:P<sub>cadBA</sub> aufgenommen. Um den Einfluss der RNA-Polymerase (RNAP) auf die Bindung von löslichen CadC-Varianten an P<sub>cadBA</sub> zu untersuchen, wurden Bindekinetiken mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase (RNAP $\alpha$ ) vorgenommen. Außerdem wurde der Einfluss der chromosomalen Lokalisation von *cadC* zu P<sub>cadBA</sub> auf die *cadBA*-Expression untersucht.

### 5.3.1 Gel-Retardationsexperimente von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> auf P<sub>cadBA</sub>

Die Gel-Retardationsexperimente wurden mit gereinigtem CadC als Positivkontrolle und mit den gereinigten Varianten CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> in steigenden Konzentrationen (0 nM - 2400 nM) durchgeführt. Als DNA-Fragmente dienten 6-Fam markierter *cadBA*-Promotor (umfasste die Sequenz von bp -328 bis +72 der *cadBA*-Promotorregion) und ein 6-Fam markiertes Kontrollfragment (umfasste 258 bp im kodierenden Bereich von *lysP*). Der *cadBA*-Promotor konnte durch CadC gebunden werden, die Bindung an das Kontrollfragment durch CadC war deutlich schwächer (Abb. 27). Die Varianten CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> zeigten sowohl an den *cadBA*-Promotor als auch an das unspezifische Kontrollfragment *lysP* Bindung (Abb. 27). Die Bindung der löslichen CadC-Varianten CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> an das unspezifische DNA-Fragment war stärker ausgeprägt war als die Bindung des Membran-integralen Wildtyp-Proteins CadC an das unspezifische DNA-Fragment. Jedoch waren keine Unterschiede in der Bindung von CadC, CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> an den *cadBA*-Promotor zu beobachten (Abb. 27).



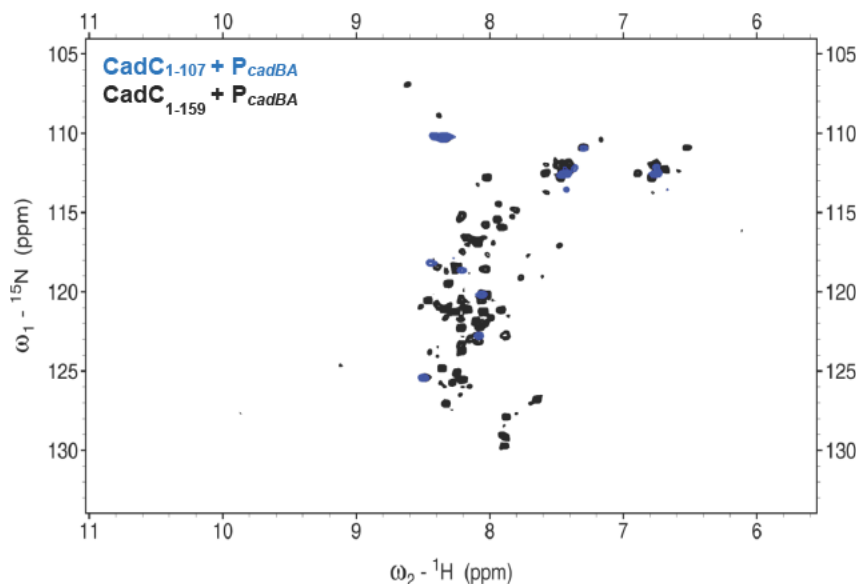
**Abb. 27: Bindung von CadC, CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> an  $P_{cadBA}$  und ein Kontrollfragment (*lysP*) in vitro.** 6-FAM markierte DNA-Fragmente des  $P_{cadBA}$  oder des Kontrollfragments wurden mit gereinigtem His<sub>10</sub>-CadC, His<sub>10</sub>-CadC<sub>1-107</sub> bzw. His<sub>10</sub>-CadC<sub>1-159</sub> in steigenden Konzentrationen zwischen 0 und 2400 nM inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 7,5%-igen (w/v) TAE gepuffertem Polyacrylamid-Gel und wurde wie beschrieben (vgl. 4.5.8) visualisiert. Freie DNA-Fragmente konnten bei den Experimenten in das Gel einlaufen, DNA-CadC-Komplexe verblieben aufgrund der größeren Masse in den Taschen bzw. wanderten nur geringfügig in das Gel ein. Der schwarze Pfeil indiziert nicht-gebundene DNA, der rote Pfeil indiziert durch CadC gebundene DNA.

### 5.3.2 NMR-Studien zur DNA-Bindung

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können Interaktionen zwischen Proteinen und Liganden untersucht werden (Cavanagh 2007). Bindet ein Ligand an das zu untersuchende Protein, so verschiebt sich das Resonanzprofil aufgrund der veränderten Umgebung der Kerne (Heydenreich 2013). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung von CadC<sub>1-107</sub> und von CadC<sub>1-159</sub> an  $P_{cadBA}$  (Ligand) mit Hilfe der NMR-Spektroskopie am Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie der Technischen Universität München untersucht werden. Dafür wurden  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren mit unterschiedlichen Konzentrationen des Liganden

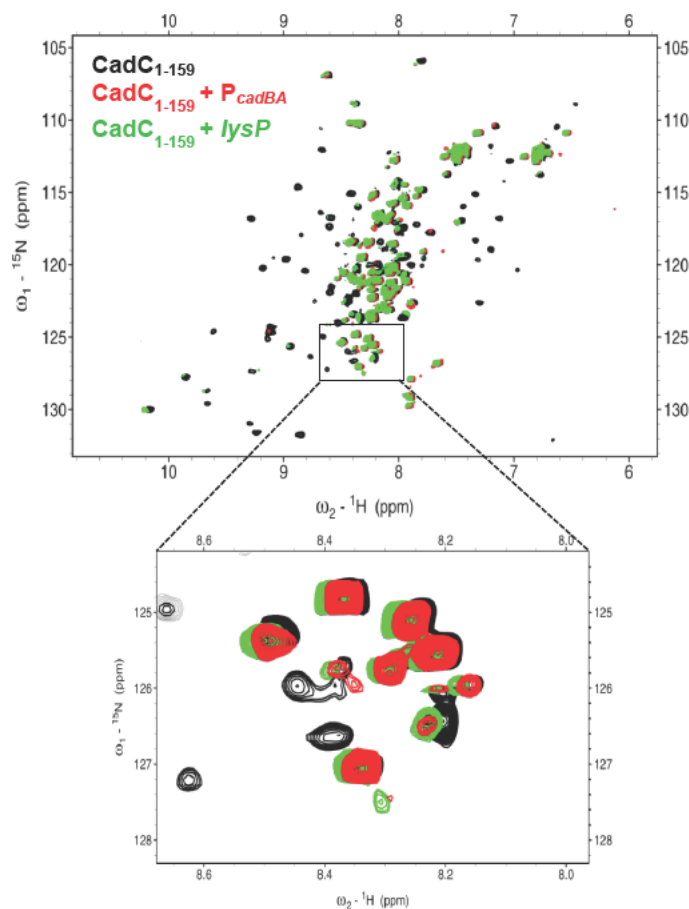


aufgenommen. Um die Größe des Protein-DNA-Komplexes in den NMR-Experimenten gering zu halten, wurde ein 17 bp großes Fragment aus  $P_{cadBA}$  [enthält das Wiederholungsmotiv (TAAACATTAAATGTTTA) der Cad1 Bindestelle, eingesetzt als Doppelstrang, ca. 11 kDa] ausgewählt, welches die Bindestelle Cad1 umfasste und monomerische Bindung von löslichen CadC-Varianten ermöglichen sollte. Die  $^{15}\text{N}$ -Markierung, Reinigung und Ankonzentrierung der CadC-Varianten erfolgte wie unter 4.3 und 4.5.2.3 beschrieben. Die Generierung der DNA-Doppelhelix erfolgte wie unter 4.5.9 beschrieben. Steigende Konzentrationen an doppelsträngiger  $P_{cadBA}$ -DNA wurden im NMR-Experiment zu 300  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -CadC<sub>1-107</sub> bzw. 300  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -CadC<sub>1-159</sub> titriert.  $P_{cadBA}$ -DNA wurde im Verhältnis 1:0; 1:0,125; 1:0,25; 1:0,5; 1:1,1; 1:1,25 und 1:1,58 zu CadC<sub>1-159</sub> titriert. Die NMR-Spektren von CadC<sub>1-107</sub> (blaue Peaks) und CadC<sub>1-159</sub> (schwarze Peaks) mit  $P_{cadBA}$  wurden anschließend überlagert (Abb. 28). Die Bindung von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> an das spezifische  $P_{cadBA}$ -DNA-Fragment führte zu Linienverbreiterung der Resonanzen. Dies implizierte, dass CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> das DNA-Bindemotiv erkannten (Abb. 28). Aminosäurereste, welche nicht an der Bindung an die DNA beteiligt waren, bzw. nicht Teil der kompakten Struktur waren, sind in blau (für CadC<sub>1-107</sub>) und schwarz (für CadC<sub>1-159</sub>) erkennbar. Die C-terminale Linkerregion in CadC<sub>1-159</sub> war nicht an der DNA-Bindung beteiligt (Abb. 28).



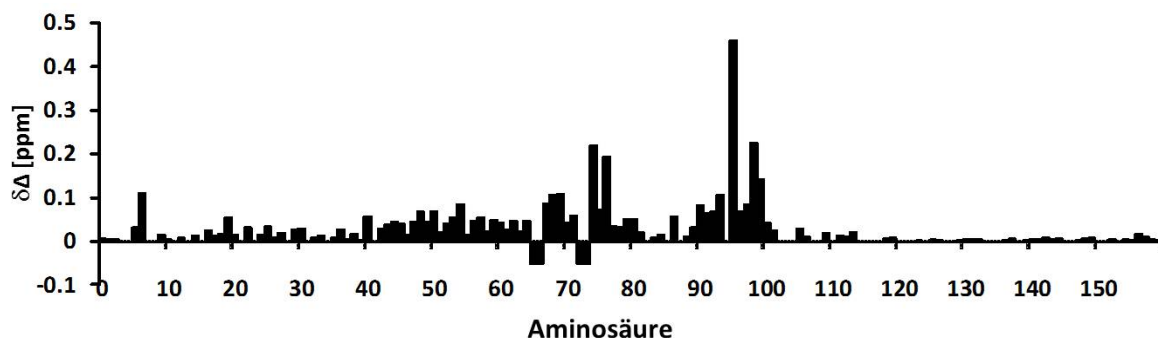
**Abb. 28: Interaktion von CadC<sub>1-107</sub> und CadC<sub>1-159</sub> mit dem *cadBA*-Promotor.** Überlagerung der  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von CadC<sub>1-107</sub> (300  $\mu\text{M}$ , blaue Peaks) und CadC<sub>1-159</sub> (300  $\mu\text{M}$ , schwarze Peaks) nach Titration von steigenden Konzentrationen  $P_{cadBA}$ -DNA (17 bp). Die C-terminale unstrukturierte Domäne von CadC<sub>1-159</sub> ist nicht in die Bindung an  $P_{cadBA}$  involviert. Die Abbildung wurde von Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, angefertigt.

Ferner wurde die Bindung von CadC<sub>1-159</sub> an ein unspezifisches DNA-Fragment (17 bp in der kodierenden Sequenz von *lysP*) analysiert. Dafür wurden <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC Spektren von CadC<sub>1-159</sub> ohne DNA, mit P<sub>cadBA</sub>-DNA (P<sub>cadBA</sub>-DNA-Fragment, 17 bp) und mit unspezifischer DNA (*lysP*-DNA-Fragment, 17 bp) aufgenommen. *lysP*-DNA wurde im Verhältnis 1:0; 1:0,125; 1:0,25; 1:0,5; 1:0,79; 1:1,1 und 1:1,22 zu CadC<sub>1-159</sub> titriert. P<sub>cadBA</sub>-DNA wurde erneut im Verhältnis 1:0; 1:0,125; 1:0,25; 1:0,5; 1:1,1; 1:1,25 und 1:1,58 eingesetzt. Die Überlagerung der Spektren zeigte, dass CadC<sub>1-159</sub> sowohl an das spezifische DNA-Fragment als auch an das unspezifische DNA-Fragment bindet (Abb. 29). An der Bindung von CadC<sub>1-159</sub> an P<sub>cadBA</sub> und an *lysP* waren die gleichen Aminosäurereste involviert (Abb. 29).



**Abb. 29: CadC<sub>1-159</sub> bindet unspezifisch an DNA.** Überlagerung der <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC Spektren von CadC<sub>1-159</sub> ohne DNA, mit P<sub>cadBA</sub>-DNA (17 bp) und mit unspezifischer DNA (*lysP*-DNA-Fragment, 17 bp). Die N-terminale Region von CadC<sub>1-159</sub> (schwarze Peaks) weist eine Tertiärstruktur auf, die Bindung an P<sub>cadBA</sub> führte zur Linienverbreiterung. Ungebundene Aminosäurereste sind im Spektrum nach Zugabe von P<sub>cadBA</sub> (rote Peaks), bzw. unspezifischer DNA (grüne Peaks) zu erkennen. Die Abbildung wurde von Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, erstellt.

Die chemische Verschiebung reagiert sehr sensitiv auf Veränderungen der Umgebung des zu untersuchenden Nukleus. Diese Veränderungen treten bei Konformationsänderungen des Proteins auf, jedoch führen auch Interaktionen mit Liganden zu Veränderungen der chemischen Verschiebung (*chemical shift perturbation-CSP*) (Heydenreich 2013). Zur Analyse von Aminosäuren in CadC<sub>1-159</sub> die potentiell an der Bindung an DNA involviert sind, wurden die Veränderungen der chemischen Verschiebung nach Zugabe eines Liganden - in diesem Experiment wurde ein spezifisches *cadBA*-Promotor-Fragment von 17 bp verwendet - untersucht. Dazu wurden Unterschiede zwischen gebundenen und freien Aminosäureresten nach Titration von DNA beobachtet (Williamson 2013). Zunächst wurde ein <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum von CadC<sub>1-159</sub> aufgenommen, nach Zugabe von DNA wurden Veränderungen der chemischen Verschiebung der Aminosäurereste dokumentiert. Aminosäuren mit großen Unterschieden sind nahe an der Interaktionsfläche zwischen Protein und Ligand lokalisiert. Daher können Aminosäurereste mit großen Veränderungen der chemischen Verschiebung als potentielle Proteinbindestellen an einen Liganden betrachtet werden (Williamson 2013). Der zytoplasmatische Linker in CadC<sub>1-159</sub> ist nicht an der DNA-Bindung beteiligt (Abb. 30). In der DNA-bindenden Domäne von CadC<sub>1-159</sub> wiesen Aminosäure I90-V104 und in der Erkennungshelix 3 die Aminosäurereste H66-T69 und E74-R76 große Unterschiede der chemischen Verschiebung auf (Abb. 30).

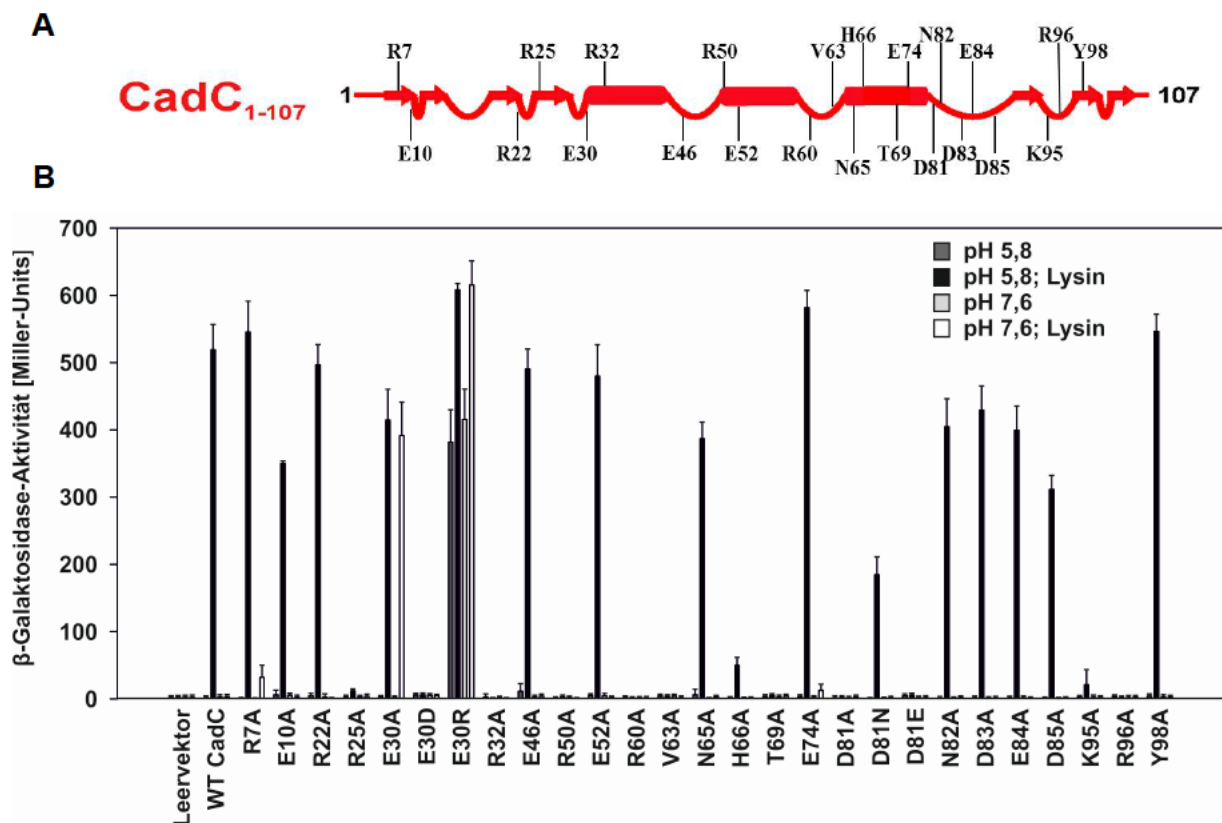


**Abb. 30: Veränderung der chemischen Verschiebung von Aminosäureresten in CadC<sub>1-159</sub> nach Zugabe von P<sub>cadBA</sub>-DNA.** Interaktion mit P<sub>cadBA</sub> konnte über Veränderungen in der chemischen Verschiebung (CSP -  $\delta\Delta$ ) von Aminosäureresten in CadC<sub>1-159</sub> detektiert werden. Potentielle Bindestellen an P<sub>cadBA</sub> sind um Aminosäure 90-104, H66-T69 und E74-R76 in CadC<sub>1-159</sub> lokalisiert. Die Abbildung wurde von Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, erstellt.

### 5.3.3 Einfluss von Aminosäuresubstitutionen auf die Interaktion mit DNA

Sowohl die Kristallstruktur als auch die NMR-Struktur der DNA-Bindedomäne von CadC wurden in dieser Arbeit gelöst. Im Folgenden sollten mögliche Kontaktstellen von CadC mit der DNA identifiziert werden. Um geeignete Aminosäurereste in CadC für eine gerichtete Mutagenese-Studie auszuwählen, wurden basierend auf der Struktur von CadC<sub>1-107</sub> (vgl. 5.2.3 und 5.2.4) auch die Ergebnisse aus den NMR-Studien von CadC<sub>1-159</sub> nach DNA-Zugabe hinzugezogen (vgl. 5.3.2). Der zytoplasmatische Linker ist nicht in die Bindung an DNA involviert, daher wurde auf Aminosäurereste der DNA-bindenden Domäne von CadC fokussiert (vgl. 5.3.2). Besonders geladene Aminosäuren sind in Proteinen als Kontaktstellen mit der DNA prädestiniert (Luger *et al.* 1997). In einem ersten Schritt wurden diese in CadC gegen Alanin substituiert. Anschließend wurden ausgewählte Aminosäurereste in CadC gegen weitere Aminosäuren ausgetauscht. Die Aminosäuren R7, E10, R22 und R25 sind in CadC in N-terminalen  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ -Strang 1-4) und den verbindenden Schleifen lokalisiert. Im Bereich der Helix  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 wurden die Aminosäurereste E30, R32, E46, R50, R60 und V63 gegen Alanin ausgetauscht. Da die Helix  $\alpha$ 3 mit der großen Furche der DNA interagiert, wurden zusätzlich die Aminosäuren N65, H66, T69 und E74 in der Erkennungshelix  $\alpha$ 3 von CadC ausgewählt. Die Aminosäuren H66, T69 und E74 in CadC zeigten auch in den NMR-Messungen nach DNA-Zugabe große Unterschiede in der chemischen Verschiebung und könnten Protein-DNA-Interaktion vermitteln (vgl. 5.3.2). Die Aminosäuren D81, N82, D83, E84 und D85 liegen in einer unstrukturierten Schleife, die C-terminal der Erkennungshelix  $\alpha$ 3 lokalisiert ist. In PhoB interagiert eine Linkerregion zwischen zwei  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ -Strang 5 und 6) mit der kleinen Furche der DNA (Blanco *et al.* 2002). Auch in CadC ist dieser Bereich für Protein-DNA-Wechselwirkungen zugänglich. Daher wurden in CadC abschließend die Aminosäuren K95, R96 und Y98, die zwischen  $\beta$ -Strang 5 und 6 liegen, gerichtet ausgetauscht.

Für die Charakterisierung der CadC-Varianten wurde der *E. coli lacZ* Reporterstamm EP314 mit den korrespondierenden Plasmiden transformiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Zellen, welche in KE-Minimalmedium unter induzierenden und nicht induzierenden Bedingungen kultiviert wurden, bestimmt (Punkt 4.3.1).



**Abb. 31: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen des DNA-Bindemotivs in CadC auf die Expression des *cadBA*-Operons.** **A**, Dargestellt ist eine schematische Abbildung der Sekundärstruktur von CadC<sub>1-107</sub> (DNA-Bindedomäne). Die Positionen der Aminosäureaustausche in der DNA-Bindedomäne wurden markiert. Pfeile markieren  $\beta$ -Stränge, Zylinder repräsentieren  $\alpha$ -Helices und Linien stellen unstrukturierte Bereiche dar. Die Abbildung wurde nach Dr. Andreas Schlundt, Technische Universität München, modifiziert. **B**, Quantifizierung der *cadBA*-Transkription in *E. coli* EP314 unter Verwendung des Reportergens *lacZ*. Die Zellen wurden in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und pH 7,6 unter Zugabe von 10 mM Lysin bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente ausgewertet.

Sowohl CadC-Varianten (CadC\_R7A, CadC\_E10A, CadC\_R22A) in N-terminalen  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ -Strang 1-3) und den verbindenden Schleifen als auch die CadC-Varianten CadC\_E46A und CadC\_E52A in der  $\alpha$ -Helix 1 induzierten die *cadBA*-Expression unter induzierenden Bedingungen, unter nicht-induzierenden Bedingungen fand keine *cadBA*-Expression statt (Abb. 31). Auch zwei CadC-Varianten mit Aminosäuresubstitution in der Erkennungshelix  $\alpha 3$  (CadC\_N65A, CadC\_E74A), CadC-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen eines negativ geladenen Clusters (CadC\_N82A, CadC\_D83A, CadC\_E84A,

CadC\_D85A) und die Variante CadC\_Y98A in  $\beta$ -Strang 6 induzierten die *cadBA*-Expression wie WT-CadC (Abb. 31). Die NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub> zeigte weniger Konvergenz und verstärkte Flexibilität in den Bereichen um Aminosäure N65 und um Aminosäure D85, dennoch wurde die Bindung an DNA nicht durch N65 und D85 in CadC vermittelt (vgl. 5.2.3). Die Varianten CadC\_R25A in  $\beta$ -Strang 4, CadC\_R32A in  $\alpha$ -Helix 1, CadC\_R50A in  $\alpha$ -Helix 2, CadC\_R60A und CadC\_V63A in einer Schleife zwischen  $\alpha$ -Helix 2 und  $\alpha$ -Helix 3, CadC\_H66A und CadC\_T69A in der Erkennungshelix  $\alpha$ 3, CadC\_D81A in einer C-terminalen Schleife und die Varianten CadC\_K95A und CadC\_R96A in einer Schleife zwischen  $\beta$ -Strang 5 und 6 konnten die *cadBA*-Expression unter keiner Testbedingung induzieren (Abb. 31). Diese Ergebnisse suggerieren eine Rolle der Aminosäuren R25, R32, R50, R60, V63, H66, T69 D81, K95 und R96 in der Interaktion von CadC mit der DNA.

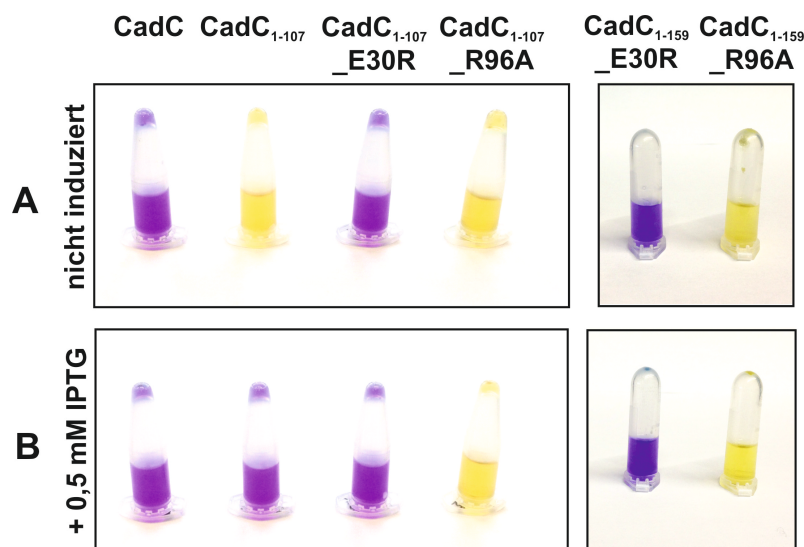
Die Variante CadC\_E30A induzierte die *cadBA*-Expression unabhängig vom pH-Wert (Abb. 31). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität lag für CadC\_E30A bei pH 5,8 und Anwesenheit von Lysin bei 415 ( $\pm$  45) Miller-Units, bei pH 7,6 und Anwesenheit von Lysin bei 392 ( $\pm$  48) Miller-Units (Abb. 31). Wurde an Position 30 in CadC Glutamat zu Aspartat substituiert, so fand keine *cadBA*-Expression statt (Abb. 31). Im Gegensatz dazu aktivierte die Variante CadC\_E30R die *cadBA*-Expression unabhängig von pH-Wert und der Anwesenheit von Lysin (Abb. 31). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen bei pH 5,8 ohne Lysin bei 382 ( $\pm$  47) Miller-Units, bei pH 5,8 und Anwesenheit von Lysin bei 608 ( $\pm$  9) Miller-Units, bei pH 7,6 ohne Lysin bei 415 ( $\pm$  44) Miller-Units und bei pH 7,6 und Anwesenheit von Lysin bei 615 ( $\pm$  35) Miller-Units (Abb. 31).

CadC\_D81 ist in einem Bereich von CadC lokalisiert, welcher mit der großen Furche der DNA interagiert (Abb. 31). CadC\_D81A konnte die *cadBA*-Expression unter allen Testbedingungen nicht induzieren (Abb. 31). Die Variante CadC\_D81N führte zu einer partiellen *cadBA*-Expression unter induzierenden Bedingungen (Abb. 31). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch CadC\_D81N lag für pH 5,8 und Anwesenheit von Lysin bei 184 ( $\pm$  26) Miller-Units (Abb. 31). Wurde an Position 81 in CadC Aspartat zu Glutamat substituiert, so fand keine *cadBA*-Expression statt (Abb. 31). Weniger die Ladung an Position 81 als die Größe der Aminosäureseitenkette war für die *cadBA*-Expression von Bedeutung. Alle CadC-Varianten wurden wie Wildtyp-CadC produziert und in die Membran integriert (Daten nicht gezeigt).

Konstitutive Aktivierung der *cadBA*-Expression durch CadC\_E30R (Abb. 31) könnte aufgrund gesteigerter Affinität zu P<sub>*cadBA*</sub> erfolgen. Diese Hypothese sollte in einem Lysindecaboxylase-Schnelltest untersucht werden (Punkt 4.3.3). Zusätzlich wurde eine

CadC-Variante analysiert, die die *cadBA*-Expression nicht induzierte und daher auch an die Bindung an die DNA beteiligt sein könnte. Dafür wurde die Variante CadC\_R96A ausgewählt. Anschließend wurden die Konstrukte CadC<sub>1-107</sub>, CadC<sub>1-159</sub>, CadC<sub>1-107</sub>\_E30R, CadC<sub>1-107</sub>\_R96A, CadC<sub>1-159</sub>\_E30R, CadC<sub>1-159</sub>\_R96A untersucht.

Sowohl für CadC<sub>1-107</sub> als auch für CadC<sub>1-159</sub> konnte in diesem Testverfahren erst nach Überproduktion CadA-Aktivität mittels eines Farbumschlages von gelb zu violett beobachtet werden (Abb. 32). Für die Varianten CadC<sub>1-107</sub>\_E30R und CadC<sub>1-159</sub>\_E30R erfolgte der Farbumschlag nach violett auch ohne Überproduktion (Abb. 32). CadC<sub>1-107</sub>\_R96A und CadC<sub>1-159</sub>\_R96A bewirkten auch nach Induktion mit 0,5 mM IPTG keinen Farbumschlag zu violett (Abb. 32). Dies könnte aus verringerter Affinität von CadC\_R96A zu P<sub>cadBA</sub> resultieren. Da durch die Varianten CadC<sub>1-107</sub>\_E30R und CadC<sub>1-159</sub>\_E30R auch ohne Überproduktion ein Farbumschlag des Lysindecaboxylase-Mediums erfolgte, könnte sich die konstitutive Aktivierung durch die Variante CadC\_E30R aufgrund gesteigerter Affinität zum *cadBA*-Promotor ereignen.



**Abb. 32: Komplementation von BL21(DE3)Δ*cadC* durch CadC, CadC<sub>1-107</sub>, CadC<sub>1-107</sub>\_E30R, CadC<sub>1-107</sub>\_R96A, CadC<sub>1-159</sub>\_E30R und CadC<sub>1-159</sub>\_R96A im Lysindecaboxylase-Schnelltest.** Die Kulturen wurden in Lysindecaboxylase-Medium über Nacht anaerob bei 37°C kultiviert und der Farbumschlag dokumentiert. Von links nach rechts: CadC, CadC<sub>1-107</sub>, CadC<sub>1-107</sub>\_E30R, CadC<sub>1-107</sub>\_R96A, CadC<sub>1-159</sub>\_E30R und CadC<sub>1-159</sub>\_R96A **A**, ohne Induktion **B**, nach Induktion mit 0,5 mM IPTG



### 5.3.4 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

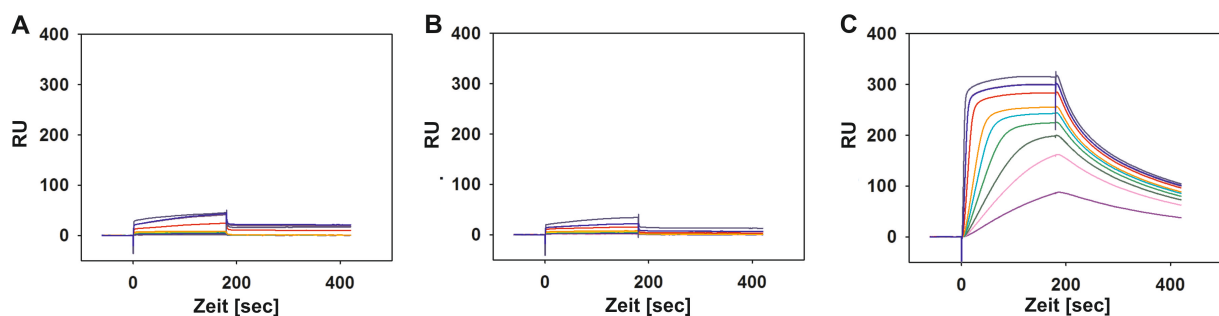
#### 5.3.4.1 Interaktion von CadC<sub>1-159</sub>, CadC<sub>1-159</sub>\_E30R und CadC<sub>1-159</sub>\_R96A mit P<sub>cadBA</sub>

Um den molekularen Bindemechanismus von CadC-Varianten (CadC<sub>1-159</sub>, CadC<sub>1-159</sub>\_E30R und CadC<sub>1-159</sub>\_R96A) an den *cadBA*-Promotor zu untersuchen, wurden Bindekinetiken mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Messungen in Echtzeit in Kooperation mit PD Dr. Ralf Heermann am Department Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Sowohl die Ergebnisse des Lysin-Decarboxylase-Schnelltest als auch die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung nach Miller (1972) führten zu der Annahme, dass die Variante CadC\_E30R gesteigerte Affinität zu P<sub>cadBA</sub> aufweist (vgl. 5.3.3). Im Gegensatz dazu wurde vermutet, dass die Variante CadC\_R96A nicht mit der DNA interagiert. Über die Bindung der CadC-Varianten an den *cadBA*-Promotor sollte die durch die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Messungen ermittelte Dissoziationskonstante Aufschluss geben. Bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wird monochromatisches Licht, welches durch ein Prisma gebrochen wird, in einem bestimmten Winkel auf einem mit Gold beschichteten SA Sensorchip reflektiert (Guo 2012). Über spezifische Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen hatte 5'-Biotin-markierte P<sub>cadBA</sub>-DNA (Ligand) an eine Streptavidinschicht des Sensorchips gebunden. Anschließend wurde CadC<sub>1-159</sub>, CadC<sub>1-159</sub>\_E30R bzw. CadC<sub>1-159</sub>\_R96A (Analyt) über den mit DNA immobilisierten Sensorchip geleitet. Molekülbindungen an der Matrix des SA Sensorchips führen zu einem veränderten Brechungswinkel des monochromatischen Lichts. Die Antwort, ausgedrückt in *Resonance Units* (RU), ist proportional zu der gebundenen Molekülmasse an der Sensorchipoberfläche (Guo 2012). Visualisiert wurde die Interaktion der CadC-Varianten an P<sub>cadBA</sub> durch ein Sensorgramm, welches RU als Funktion der Zeit darstellt. His<sub>10</sub>-CadC<sub>1-159</sub>, His<sub>10</sub>-CadC<sub>1-159</sub>\_E30R und His<sub>10</sub>-CadC<sub>1-159</sub>\_R96A wurden überproduziert und über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Punkt 4.5.2.3). Für die Messungen wurde ein 41 bp DNA-Fragment des *cadBA*-Promotors gewählt, welches die Cad1- und die Cad2-Bindestelle umfasste. Als DNA-Kontrollfragment für unspezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen wurde der *yjiY*-Promotor aus *E. coli* eingesetzt.

Um den Anteil an biologisch aktivem Protein, d.h. Protein welches an DNA bindet, zu bestimmen, wurde eine *Calibration-free concentration*-Analyse durchgeführt. Das CFCA-Experiment für CadC<sub>1-159</sub>\_E30R zeigte, dass 3% des Proteins aktiv mit der DNA interagierten (Abb. A2). Bindekinetiken wurden mit steigenden Konzentrationen (0,01 µM- 10 µM) von



CadC<sub>1-159</sub>, CadC<sub>1-159</sub>\_E30R und CadC<sub>1-159</sub>\_R96A und einer Assoziationszeit von 180 sec mit anschließender Dissoziationszeit von 300 sec aufgenommen. Der Diffusionskoeffizient von CadC<sub>1-159</sub>\_E30R wurde als  $D=1,179 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  bestimmt. Die Initialraten der Proteinverdünnungen die mindestens Unterschiede des Faktors 1,5 zeigten, wurden für die Kalkulation der „aktiven“ Konzentration verwendet, welche  $1,5 \times 10^{-7} \text{ M}$  für CadC<sub>1-159</sub>\_E30R betrug. Es konnte beobachtet werden, dass CadC<sub>1-159</sub> sowohl mit spezifischer  $P_{cadBA}$ -DNA als auch mit unspezifischer DNA interagiert. Eine starke Bindung von CadC<sub>1-159</sub> an DNA wurde detektiert, da sich die Dissoziation des CadC<sub>1-159</sub> von  $P_{cadBA}$  langsam ereignete (Abb. 33 A). Die Affinität von CadC<sub>1-159</sub>\_R96A an  $P_{cadBA}$  war deutlich schwächer, als die Bindung von CadC<sub>1-159</sub> an  $P_{cadBA}$ . Die stärkste Interaktion mit  $P_{cadBA}$  konnte für CadC<sub>1-159</sub>\_E30R detektiert werden (Abb. 33 C). Basierend auf dem CFCA-Experiment wurde die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von CadC<sub>1-159</sub> mit 11,5 nM, von CadC<sub>1-159</sub>\_R96A mit 28,7 nM und von CadC<sub>1-159</sub>\_E30R mit 0,4 nM bestimmt.



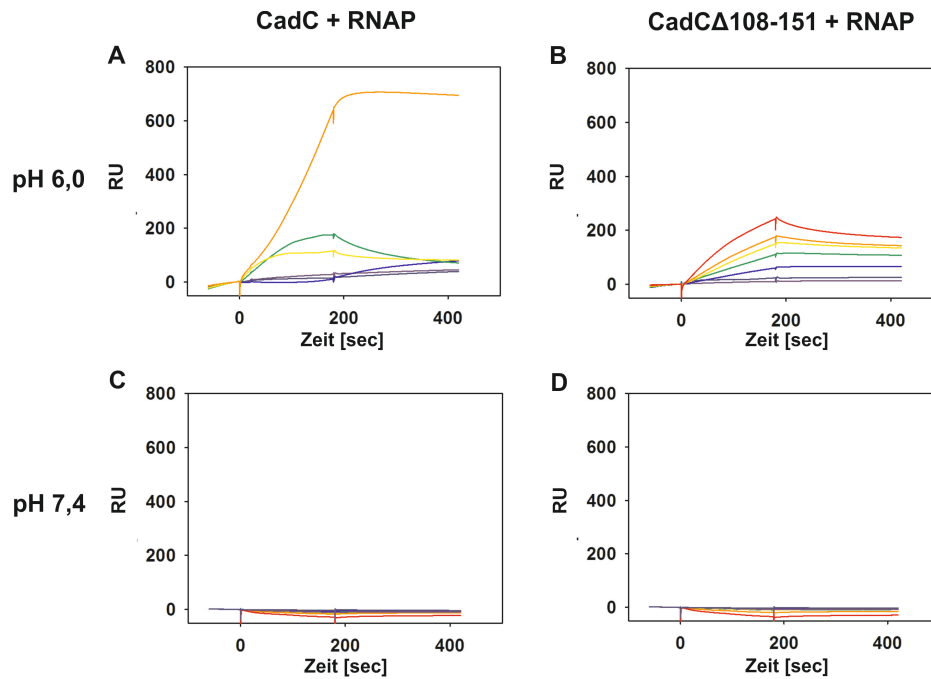
**Abb. 33: Bindung von CadC<sub>1-159</sub> (A), CadC<sub>1-159</sub>\_R96A (B) und CadC<sub>1-159</sub>\_E30R (C) an die Promotorregion von *cadBA*.** Ein Biotin-markiertes  $P_{cadBA}$ -DNA-Fragment wurde auf einen SA Sensorchip immobilisiert. Anschließend wurden gereinigtes CadC<sub>1-159</sub>, CadC<sub>1-159</sub>\_R96A oder CadC<sub>1-159</sub>\_E30R in steigenden Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  (violette Linie), 0,02  $\mu\text{M}$  (rosa Linie), 0,05  $\mu\text{M}$  (dunkelgrüne Linie), 0,1  $\mu\text{M}$  (hellgrüne Linie), 0,25  $\mu\text{M}$  (blaue Linie), 0,5  $\mu\text{M}$  (orange Linie), 1  $\mu\text{M}$  (rote Linie), 5  $\mu\text{M}$  (dunkelblaue Linie) und 10  $\mu\text{M}$  (lila Linie) titriert. Die Assoziationszeit betrug 180 sec, die anschließende Dissoziationszeit 300 sec. Die ermittelten  $K_d$ -Werte betrugen basierend auf dem CFCA-Experiment 11,5 nM für CadC<sub>1-159</sub> (A), 28,7 nM für CadC<sub>1-159</sub>\_R96A (B) und 0,4 nM für CadC<sub>1-159</sub>\_E30R (C).

#### 5.3.4.2 Interaktion von CadC mit der RNA-Polymerase

In Gel-Retardationsexperimenten und bei den Messungen zur NMR-Spektroskopie konnte eine unspezifische Bindung von zytoplasmatischen CadC an DNA beobachtet werden (vgl. 5.3.1 und 5.3.2). Eine permanente Bindung von CadC an den *cadBA*-Promotor würde

Spezifität gewähren, jedoch müsste ein weiterer Regulationsmechanismus stattfinden um konstitutive Promotoraktivität zu verhindern. In *E. coli* findet eine permanente Bindung des Transkriptionsregulators OxyR an die DNA statt. Die Regulation der Expression erfolgt durch Interaktion mit der RNA-Polymerase nach Stimulus-abhängiger Konformationsänderung (Choi *et al.* 2001). Um die Interaktion zwischen der RNAP und CadC-Varianten bei pH 6,0 und bei pH 7,4 zu untersuchen, wurden SPR-Experimente in Kooperation mit PD Dr. Ralf Heermann am Department Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt. Über spezifische Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung hatte 5'-Biotin-markierte  $P_{cadBA}$ -DNA (Ligand) an eine Streptavidinschicht des SA Sensorchips gebunden. Als Analyt wurde *E. coli* RNAP (Affymetrix, USA), rekonstituiertes CadC und rekonstituiertes CadC $\Delta$ 108-151 ausgewählt und über den mit DNA immobilisierten Sensorchip geleitet. CadC $\Delta$ 108-151 aktivierte in in vivo Aktivitätsmessungen die *cadBA*-Expression bei neutralen Bedingungen, während CadC die *cadBA*-Expression bei neutralen externen Bedingungen induzierte (vgl. 5.1.3). Visualisiert wurde die Interaktion der CadC-Varianten mit der RNAP an  $P_{cadBA}$  durch ein Sensorgramm, welches RU als Funktion der Zeit darstellt. His<sub>10</sub>-CadC und His<sub>10</sub>-CadC $\Delta$ 108-151 wurden überproduziert, über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und wie unter Punkt 4.5.3 in *E. coli* Proteoliposomen rekonstituiert. Für die Messungen wurde ein 41 bp DNA-Fragment des *cadBA*-Promotors gewählt, welches die Cad1-Bindestelle umfasste. Als DNA-Kontrollfragment für unspezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen wurde der *yjiY*-Promotor aus *E. coli* eingesetzt. Eine Lösung aus CadC bzw. CadC $\Delta$ 108-151 in verschiedenen Konzentration (0,01  $\mu$ M - 1  $\mu$ M) und RNAP (1  $\mu$ M) floss mit einer Kontaktzeit von 180 sec gefolgt von 300 sec Dissoziationszeit in HBS-EP-Puffer (pH 6,0 bzw. pH 7,4) über alle Flusszellen.

Es konnte beobachtet werden, dass sowohl CadC als auch CadC $\Delta$ 108-151 stärker mit der RNAP bei niedrigem pH-Wert (pH 6,0) interagierten als bei physiologischen Bedingungen (pH 7,4) (Abb. 34). Auch war die Interaktion bei pH 6,0 von CadC mit der RNAP deutlich stärker als von CadC $\Delta$ 108-151 mit der RNAP (Abb. 34 A und B). Bei physiologischem pH-Wert konnte keine Protein/RNAP-Interaktionen gemessen werden (Abb. 34 C und D). In weiteren SPR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung der RNAP aus *E. coli* an DNA nicht von der Anwesenheit von CadC abhängig ist (Daten nicht gezeigt).

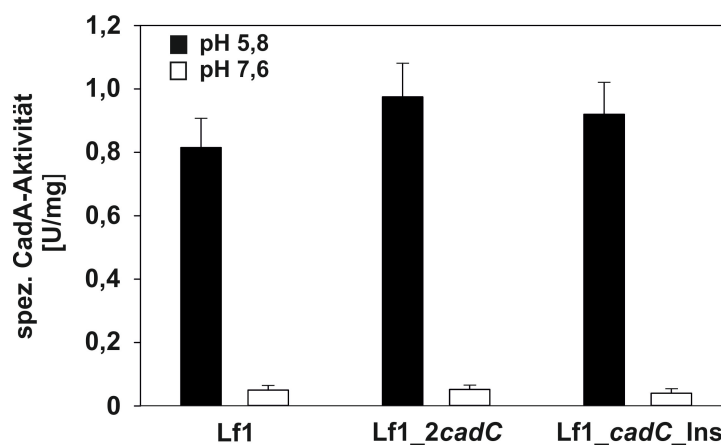


**Abb. 34: Interaktion von CadC und CadCA108-151 mit der RNA-Polymerase aus *E. coli* bei pH 6,0 und pH 7,4.** Ein Biotin-markiertes  $P_{cadBA}$ -DNA-Fragment wurde auf einen SA Sensorchip immobilisiert. Anschließend wurden rekonstituiertes CadC bzw. CadCA108-151 in steigenden Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  RNAP über den Sensorchip geleitet. **A**, Interaktion zwischen CadC und der RNAP bei pH 6,0 **B**, Interaktion zwischen CadCA108-151 und der RNAP bei pH 6,0 **C**, Interaktion zwischen CadC und der RNAP bei pH 7,4 **D**, Interaktion zwischen CadCA108-151 und der RNAP bei pH 7,4

### 5.3.5 Einfluss der Lokalisation von *cadC* zu $P_{cadBA}$ auf die *cadBA*-Expression

In DNA-Bindeexperimenten konnte eine unspezifische Bindung an DNA gezeigt werden (vgl. 5.3.1 und 5.3.2). Eine permanente Bindung des Transkriptionsregulators CadC an die Promotorregion des *cadBA*-Operons ist vorstellbar. Nach Wahrnehmung des externen Reizes durch CadC könnten Umlagerungen im unstrukturierten Linker in der Interaktion zwischen RNA-Polymerase und CadC resultieren und somit könnte Transkription des *cadBA*-Operons stattfinden. Um die Rolle der Lokalisierung von *cadC* hinsichtlich der Aktivierung des *cadBA*-Operons unter dem Aspekt der gekoppelten Transkription und Translation (Amster-Choder, 2011) und der unmittelbar folgenden Membranintegration von CadC in der Nähe des *cadBA*-Operons zu untersuchen, wurde ein Stamm erstellt, der eine Veränderung der chromosomalen Position des *cadC*-Gens aufweist. Im Rahmen eines Forschungspraktikums wurde in einem ersten Schritt über Red/ET Rekombination (Gene Bridges, Heidelberg) in den

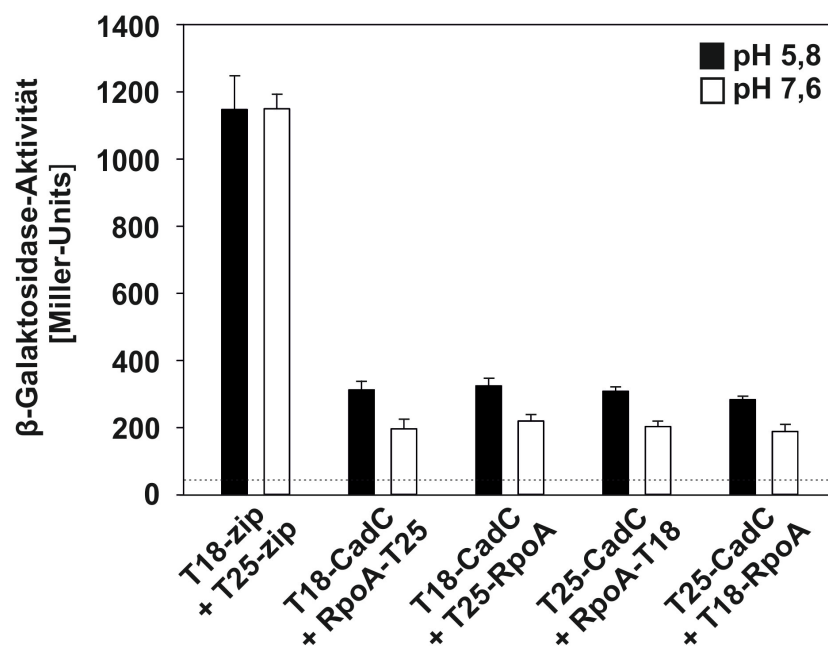
*E. coli* Stamm LF1 (Fried *et al.* 2012) ein weiteres chromosomales *cadC*-Gen inseriert (Rausch 2013). Anschließend wurde das native *cadC*-Gen des konstruierten *E. coli* Stammes LF1\_2*cadC* mit Hilfe von erneuter homologer Red/ET Rekombination deletiert. Der resultierende Stamm *E. coli* LF1\_2*cadC* und der Stamm LF1\_2*cadC* wurde über die Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität aus zellfreien Extrakten als Maß für die Expression des *cadBA*-Operons charakterisiert. Hierfür wurden die Zellen bei pH 5,8 und pH 7,6 bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase kultiviert (vgl. 4.3), anschließend wurden Proben entnommen und die spezifische CadA-Aktivität wie unter 4.5.11 beschrieben bestimmt. Als Positivkontrolle diente der *E. coli* Stamm LF1 (Fried *et al.* 2012). CadA-Aktivität konnte für die Stämme LF1, LF1\_2*cadC* und LF1\_2*cadC* unter induzierenden Bedingungen gemessen werden (Abb. 35). Diese lag für den Stamm *E. coli* LF1 bei pH 5,8 und Anwesenheit von Lysin bei  $0,8 (\pm 0,1) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ , für *E. coli* LF1\_2*cadC* bei  $1,0 (\pm 0,1) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$  und für *E. coli* LF1\_2*cadC* bei  $0,9 (\pm 0,1) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$  (Abb. 35). Die spezifische CadA-Aktivität unterschied sich in LF1\_2*cadC* und LF1\_2*cadC*-Ins nicht wesentlich von der gemessenen CadA-Aktivität in *E. coli* LF1 (Abb. 35) und die Lokalisation von *cadC* zur *cadBA*-Promotorregion im Chromosom spielte keine Rolle für die Aktivierung des Cad-Systems.



**Abb. 35: Spezifische CadA-Aktivität in *E. coli* LF1, *E. coli* LF1\_2*cadC* und *E. coli* LF1\_2*cadC*\_Ins in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen.** *E. coli* LF1, LF1\_2*cadC* und LF1\_2*cadC*\_Ins wurden in LB-Komplexmedium mikroaerob bei pH 5,8 und pH 7,6 bis zu Beginn der stationären Phase kultiviert und anschließend die spezifische CadA-Aktivität als Maß für die *cadBA*-Expression bestimmt. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Experimenten.

### 5.3.6 Interaktion von CadC mit der RNAP $\alpha$ -Untereinheit

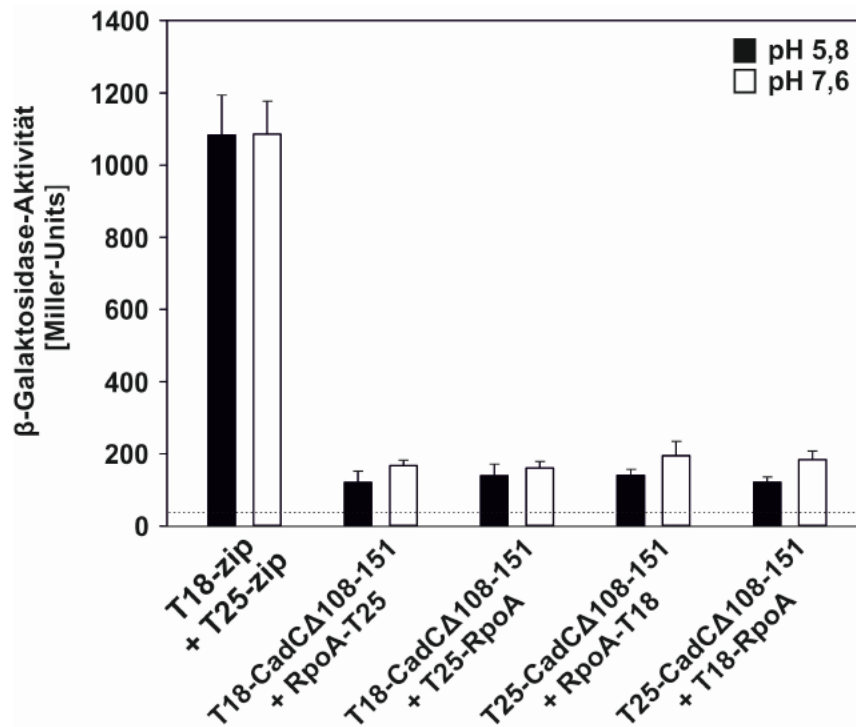
In DNA-Bindeexperimenten wurde unspezifische Bindung der zytoplasmatischen Domäne von CadC an DNA detektiert (vgl. 5.3.1). Daher wurde hypothetisiert, dass nicht die Affinität von CadC zur DNA die *cadBA*-Transkription vermittelt sondern die Interaktion mit der RNA-Polymerase zur *cadBA*-Expression führt. Die Transkription in Prokaryoten benötigt koordinierte Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen, zusätzlich zu den Untereinheiten der RNAP sind oftmals auch Transkriptionsfaktoren beteiligt. Die RNAP $\alpha$ -Untereinheit (*rpoA*) ist eines der regulatorischen Schlüsselemente der Gentranskription und interagiert direkt mit anderen Proteinen (Rippa *et al.* 2010). Die Interaktion der RNAP mit CadC wurde bei unterschiedlichen äußeren Bedingungen in vivo mit dem BACTH-System untersucht.



**Abb. 36: Interaktion von CadC mit RpoA in Abhängigkeit des pH-Wertes.** Eine in vivo BACTH-Analyse wurde zur Identifikation der Interaktion von T18-CadC/RpoA-T25, T18-CadC/T25-RpoA, T25-CadC/RpoA-T18 und T25-CadC/T18-RpoA verwendet. Die Zellen wurden mikroaerob bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 30°C in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und 7,6 und 0,5 mM IPTG kultiviert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde als Maß für die Interaktion von CadC und RNAP $\alpha$  bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt die Hintergrundaktivität an. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Analyse wurden die Hybridproteine T18-CadC und T25-CadC verwendet (Rauschmeier *et al.* 2014) und die Hybridproteine T18-RpoA (*rpoA* im Vektor pUT18C), RpoA-T18 (*rpoA* im Vektor pUT18), T25-RpoA (*rpoA* im Vektor pKNT25) und RpoA-T25 (*rpoA* im Vektor pKT25) konstruiert. Als Kontrolle für die Komplementation dienten die Proteine T25-zip und T18-zip (Dimerisierung des Transkriptionsfaktors GCN4, zip). Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 5.1.5 beschrieben. CadC und die RNAP $\alpha$  interagierten bei niedrigem pH-Wert und bei physiologischem pH-Wert (Abb. 36). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen bei ca. 200 ( $\pm$  20) Miller-Units (MU) bei pH 7,6. Die Interaktion zwischen CadC und RpoA lag bei pH 5,8 bei ca. 320 ( $\pm$  25) Miller Units (Abb. 36). Die gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen über der Hintergrundaktivität (gestrichelte Linie, Abb. 36).

In einem weiteren Experiment wurde eine Interaktionsstudie zu CadCA108-151 und RpoA durchgeführt. Dazu wurden die Hybridproteine T18-CadCA108-151 und T25-CadCA108-151 und T18-RNAP $\alpha$ , RpoA-T18, T25-RpoA und RpoA-T25 verwendet. Anschließend wurde die Interaktion von RpoA mit CadCA108-151 *in vivo* mittels BACTH untersucht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im *E. coli* Stamm BTH101 unter mikroaeroben Bedingungen bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase (vgl. 4.3.2). Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Interaktion zwischen CadCA108-151 und RpoA bestimmt (Punkt 4.5.10.2). Als Kontrolle für die Komplementation dienten die Hybridproteine T25-zip und T18-zip, welche unter allen Testbedingungen stark interagierten (Abb. 37). T18-CadCA108-151 und T25-RpoA und RpoA-T25, bzw. T25-CadCA108-151 und T18-RpoA und RpoA-T18 zeigten Interaktion bei pH 5,8 und pH 7,6 (Abb. 37). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen unter induzierenden Bedingungen für die Interaktionspartner T18-CadCA108-151 und T25-RpoA bei 121 ( $\pm$  30) Miller-Units, für T18-CadCA108-151 und RpoA-T25 bei 139 ( $\pm$  30) Miller-Units, für T25-CadCA108-151 und T18-RpoA bei 140 ( $\pm$  14) Miller-Units und für T25-CadCA108-151 und RpoA-T18 bei 121 ( $\pm$  12) Miller-Units (Abb. 37). Die Hintergrundaktivität (gestrichelte Linie, Abb. 37) lag unter den gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten.



**Abb. 37: Interaktion von CadCA108-151 mit RpoA in Abhängigkeit des pH-Wertes.** Eine in vivo BACTH-Analyse wurde zur Identifikation der Interaktion von T18-CadCA108-151/RpoA-T25, T18-CadCA108-151/T25-RpoA, T25-CadCA108-151/RpoA-T18 und T25-CadCA108-151/T18-RpoA verwendet. Die Zellen wurden mikroaerob bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 30°C in KE-Minimalmedium bei pH 5,8 und 7,6 und 0,5 mM IPTG kultiviert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde als Maß für die Interaktion von CadCA108-151 und RpoA bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte sowie Standardabweichungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

## 6 Diskussion

### 6.1 Der CadC-Linker ist unstrukturiert

Der Transkriptionsregulator CadC besteht aus einer N-terminalen zytoplasmatischen DNA-Bindedomäne (As 1-107), einer C-terminalen periplasmatischen Sensordomäne (As 179-512) und einer einzelnen Transmembranhelix (As 159-178) (Merrell & Camilli 2000; Miller *et al.* 1987; Rauschmeier *et al.* 2014). Eine Linkerregion (As 108-158) verbindet die DNA-Bindedomäne und die Transmembranhelix. Eine bioinformatische Analyse zeigte signifikante Homologie für die DNA-bindende Domäne und die periplasmatische Sensordomäne aus *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shewanella piezotolerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fischeri*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio vulnificus*, *Serratia odorifera*, *Edwardsiella tarda* und *Vibrio harveyi*, jedoch war die Aminosäuresequenz der Linkerregion nicht konserviert und unterschied sich in der Länge. Die Analyse der zytoplasmatischen Domäne (As 1-159) mittels NMR-Spektroskopie konnte keine Sekundärstrukturelemente in der Linkerregion identifizieren. Die NMR-Spektroskopie offenbarte eine kompakte und rigide Faltung der DNA-Bindedomäne, während sich die Region von As 108-159 durch Flexibilität auszeichnete. Unstrukturierte Proteinregionen können eine Vielzahl von Funktionen, wie die Reduktion von Proteinressourcen, als individuelles Bindetarget für Liganden, die Steigerung der Bindspezifität bei geringer Affinität, die Erhöhung der Binderate, die Exposition von posttranslationalen Modifikationsstellen, als flexible Linker, die Verhinderung von Proteinaggregation und eine erhöhte Stressresistenz innehaben (Liu & Huang 2014). Das Cad-System in *E. coli* wird bei niedrigen pH-Werten exprimiert. Säurestress wirkt sich allerdings negativ auf die Struktur und Funktion von gefalteten Proteinen aus. Unstrukturierte Proteinregionen sind bei ungünstigen äußeren Umwelteinflüssen stabiler als gefaltete Proteindomänen (Liu & Huang 2014). So konnte für das humane, unstrukturierte Prothymosin  $\alpha$  gezeigt werden, dass die Proteinaktivität nach starkem Hitzestress erhalten blieb (Uversky 2013). Agieren unstrukturierte Proteinregionen als flexible Linker, so dienen sie als verbindendes Element zwischen Signaleingangs- und Signalausgangsdomäne und offerieren freie Rotation im Raum (Liu & Huang 2014).



## 6.2 Der CadC-Linker toleriert eine Vielzahl an Aminosäuresubstitutionen

Unstrukturierte Proteinregionen (> 50 Aminosäuren) treten in funktionalen Proteinen häufig auf (Dunker *et al.* 2002). Jedoch wurde erst kürzlich die Rolle dieser Regionen in der Regulation der Transkription, der Translation und in der Signaltransduktion erkannt (Wright & Dyson 1999). Oftmals sind unstrukturierte Proteinregionen durch einen niedrigen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp und Tyr) und einen hohen Gehalt an polaren und geladenen Aminosäuren (Gln, Ser, Pro, Glu und Lys) gekennzeichnet (Dyson & Wright 2005). Eine Beteiligung von geladenen Aminosäureresten (E125, D131, E147, <sup>109</sup>EEEGEE<sup>114</sup> und <sup>152</sup>KSKR<sup>155</sup>) an der Signaltransduktion konnte mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese-Studie im zytoplasmatischen CadC-Linker ausgeschlossen werden. Auch wurden Insertionen von zusätzlichen Prolinresten toleriert. Für unstrukturierte Proteine oder Proteinregionen konnte die Faltung in eine geordnete Struktur nach Bindung an einen Liganden oder nach Signalrezeption nachgewiesen werden. So ist die phosphorylierte Kinase-induzierbare Domäne (pKID) des Transkriptionsfaktors CREB (*Cyclic-AMP-Response-Element-Binding Protein*) in Lösung unstrukturiert, jedoch findet eine Faltung nach Komplexbildung mit der KID-Bindedomäne des CREB-Bindeproteins statt (Radhakrishnan *et al.* 1998). Die Substitution einer kurzen Region mit niedriger Konfidenz zur Bildung einer  $\alpha$ -Helix im zytoplasmatischen Linker von CadC (<sup>146</sup>PEQSPV<sup>151</sup>) widerlegte die Bildung einer transienten  $\alpha$ -Helix in dieser Region nach Signalwahrnehmung durch CadC. Dies unterstützte die Idee, dass die Unstrukturiertheit und die Flexibilität des Linkers für die Aktivität von CadC entscheidender waren, als die Aminosäurekomposition. Daher wird die Signaltransduktion mittels des CadC-Linkers eher durch strukturelle als durch sequentielle Eigenschaften vermittelt. In *E. coli* FtsZ konnte ein flexibler Linker ohne Funktionsverlust gegen unstrukturierte Regionen anderer Organismen ausgetauscht werden (Gardner *et al.* 2013).

Wurde der CadC-Linker gegen eine konservierte S-Helix aus dem *E. coli* Nitratsensor NarX substituiert, so konnte keine *cadBA*-Expression detektiert werden. In HAMP-Domänen wird ein Modell favorisiert, in welchem Signaltransduktion durch eine Rotationsbewegung der helikalen Elemente vermittelt wird (Hulko *et al.* 2006). Durch Insertion der S-Helix in CadC, welche mit der HAMP-Domäne aus NarX überlappt, könnte nach Signalperzeption eine Drehbewegung im Zytoplasma erfolgen und die Interaktion mit der RNA-Polymerase oder die Bindung an den *cadBA*-Promotor verhindern.

Auch nach Austausch des Linkers in CadC gegen flexible Elastin-ähnliche Polypeptide (ELP) konnte keine *cadBA*-Expression detektiert werden. ELPs enthalten Wiederholungen der Aminosäuren VPGXG (Smits *et al.* 2014). Es wurden CadC-Hybridproteine mit zehn oder zwanzig Wiederholungen der Motive VPGVG, VPGEV und VPGKG generiert. Elastin verleiht einer Vielzahl von humanen Gewebearten, wie der Lunge, der Haut oder den Arterien ihre Elastizität (Daamen *et al.* 2007). Das Cad-System wird bei saurem externen Milieu induziert. Werden geladene ELPs neutralisiert, so können ELPs bei isothermen Bedingungen einer Konformationsänderung unterliegen (MacKay *et al.* 2010). Daher wird für geladene CadC-Hybridproteine (Motive VPGEV und VPGKG) eine Rolle des pH-Werts bei konformationellen Änderungen innerhalb der ELPs angenommen. Strukturelle Veränderungen innerhalb des inserierten ELP-Linkers in CadC könnten die Signaltransduktion stören und zum Erliegen der *cadBA*-Expression bei aktivierenden Bedingungen führen. So konnte bei pH-Werten unter 6,4 Bildung von Mizellen bei Elastin-ähnlichen Polypeptiden beobachtet werden (Callahan *et al.* 2012). Außerdem ist bekannt, dass ELPs in Abhängigkeit von der Temperatur Konformationsänderungen von unstrukturierten Schleifen zu strukturierten  $\beta$ -Strängen vollziehen. Da die untere kritische Lösungstemperatur der ELP-Polypeptide von der Polarität und der Länge der eingesetzten ELPs abhängig ist (Smits *et al.* 2014), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass CadC-Elastin-Hybridproteine die *cadBA*-Expression aufgrund von temperaturabhängigen Konformationsänderungen nicht induzieren konnten.

### 6.3 Der CadC-Linker reagiert sensitiv auf Verkürzungen

Substitution des Linkers in *E. coli* FtsZ gegen Linkerregionen anderer Prokaryoten oder sogar gegen eukaryotische Linkerregionen wirkte sich nicht auf die Funktionalität des Proteins aus, jedoch erwies sich die Länge des Linkers als limitierender Faktor für die Funktionalität von FtsZ. So führten Linkerregionen mit einer Länge von weniger als 43 Aminosäureresten oder mehr als 95 Aminosäureresten zum Aktivitätsverlust von FtsZ. Es wurde hypothetisiert, dass der C-terminale Linker in FtsZ als flexible Verknüpfung zwischen der globulären Domäne in FtsZ am Protofilament und FtsA/ZipA an der Membran fungiert (Gardner *et al.* 2013). In CadC hatte die Verkürzung der Linkerregion Einfluss auf die strukturelle Integrität von CadC. Diese Auswirkungen könnten zu drei möglichen Szenarien führen. Es ist vorstellbar, dass die Signaltransduktion durch die Linker-Verkürzungen unterbunden wird und in einem inaktiven CadC-Phänotyp resultiert. Des Weiteren kann durch konformationelle Änderungen ein

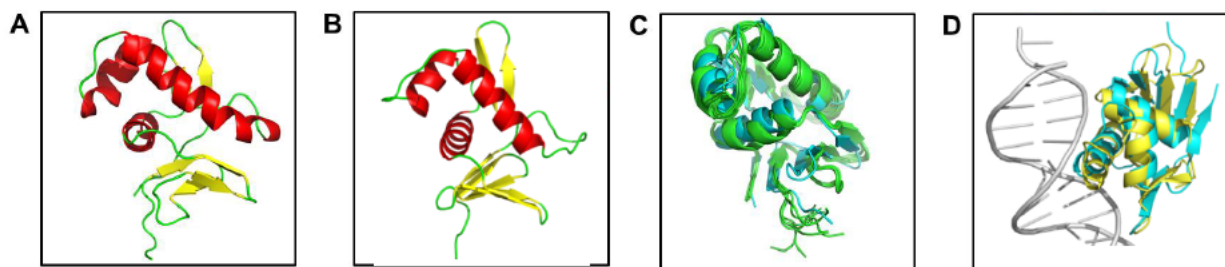
konstitutiv aktiver Phänotyp entstehen. Ferner ist eine Invertierung der Signalverarbeitung im Zytoplasma möglich. Alle genannten Auswirkungen waren nach Verkürzung des zytoplasmatischen Linkers in CadC zu beobachten. Die vollständige Deletion des Linkers resultierte in pH-deregulierter CadC-Aktivität, während die Verkürzung von großen Bereichen des Linkers zur konstitutiv aktiver *cadBA*-Expression führte. Die Verkürzung kleiner Linkerregionen und die Verlängerung des zytoplasmatischen Linkers übte keinen Einfluss auf die Aktivität des Cad-Systems aus. Verringerte, jedoch konstitutive *cadBA*-Aktivität in zwei CadC-Varianten (CadC $\Delta$ 120-151 und CadC $\Delta$ 128-151) könnte auch aufgrund von Effekten auf die Kopienzahl in Abhängigkeit des Translationsfaktors EF-P resultieren (Ude *et al.* 2013), da sich diese Verkürzungen im Bereich von zwei Polyprolin-haltigen Regionen (As 120-124 und As 145-146) befanden. Die invertierte pH-Antwort in CadC $\Delta$ 115-151 suggeriert, dass in Abwesenheit großer Linkerbereiche das externe Signal durch die periplasmatische Domäne sensiert wird, jedoch im Zytoplasma fehlerhaft interpretiert wird. Die Linkerregion (~ 50 As) in *E. coli* EnvZ, einer Membran-integralen Sensorkinase, unterliegt einer Konformationsänderung um die korrekte Positionierung der EnvZ Monomere zu sichern (Park & Inouye 1997). Auch die Bindung von CadC an den *cadBA*-Promotor oder Interaktion mit der RNAP könnte durch Konformationsänderung im zytoplasmatischen Linker modelliert werden. In NifL aus *Azotobacter vinelandii* werden zwei PAS-Domänen durch eine Linkerregion verbunden und Verkürzungen des Linkers verifizierten eine Rolle dieser Region in der Signalweiterleitung. Verkürzungen von wenigen Aminosäuren hatten keinem Effekt auf die Aktivität von NifL, die Deletion von großen Linkerregionen resultierte in inaktivem Phänotyp oder in Wildtyp-Aktivität. Mit beinahe vollständiger Verkürzung des NifL-Linkers konnte auch unter nicht induzierbaren Bedingungen Aktivität gemessen werden. NifL inhibiert NifA bei Anwesenheit von Sauerstoff, die Aktivität unter nicht induzierbaren Bedingungen wurde auf eine mangelhafte Inhibierung durch NifL zurückgeführt (Little *et al.* 2012).

#### **6.4 Die DNA-Bindedomäne in CadC umfasst ein winged Helix-Turn-Helix-Motiv**

Bisher konnte die vollständige Struktur eines Transkriptionsregulators aus der Familie der ToxR-ähnlichen Proteine nicht gelöst werden. In einer früheren Arbeit wurde die Kristallstruktur der periplasmatischen Sensordomäne von CadC (As 188-512) mittels Röntgenstrukturanalyse mit 1,8 Å aufgeklärt (Eichinger *et al.* 2011). Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit konnte die Struktur des N-terminalen DNA-Bindemotivs mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie und in einem parallelen Ansatz mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst werden. Kristallstrukturen repräsentieren eine Momentaufnahme des zu untersuchenden Proteins, während die NMR-Spektroskopie ein dynamisches Bild des Proteins aufzeigt (Hennig & Sattler 2014). Vorteile der Röntgenstrukturanalyse sind in einer hohen Auflösung bis zu 1 Å gegeben und dass im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie auch die Untersuchung großer Proteine und Komplexe möglich ist. Allerdings werden die Dynamiken der Proteine in Lösung vernachlässigt. Die NMR-Spektroskopie ist durch die Größe des zu untersuchenden Proteins eingeschränkt, so konnten bisher nur Proteine mit einem maximalen Molekulargewicht von etwa 25 kDa gelöst werden (Kwan *et al.* 2011). Die Stärken und Schwächen der beiden Methoden der Strukturaufklärung ergänzen sich, so dass anhand der parallelen Durchführung beider Techniken die Aufklärung unterschiedlicher Fragestellungen bei der Strukturanalyse eines Proteins ermöglicht wird. Für die Aufklärung der Struktur der DNA-Bindedomäne mittels NMR-Spektroskopie wurden 2021 zugeordnete NOEs miteinbezogen. Daraus wurden 100 Strukturen berechnet und die 20 energieärmsten Strukturen computergestützt ausgewählt. Da die Strukturanalyse auf einer Vielzahl von Messungen besteht, könnten die Dynamiken von CadC<sub>1-107</sub> ideal betrachtet werden. Dem zytoplasmatischen CadC-Linker wurde aufgrund fehlender Sekundärstrukturelemente keine einheitliche NMR-Struktur zugeordnet. Die NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub> umfasste ein „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv aus der Familie der OmpR-ähnlichen Regulatoren und vier N-terminalen und drei C-terminalen  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Abb. 38 A). Die Topologie des OmpR-ähnlichen Regulators PhoB zeigt zwei C-terminale  $\beta$ -Faltblattstrukturen, der dritte C-terminale  $\beta$ -Strang ( $\beta$ -Strang 7) in CadC stellt eine Besonderheit innerhalb dieser Familie dar. Ein Sequenzvergleich von Proteinen der OmpR-Familie zeigte keine Sequenzhomologie im Bereich des  $\beta$ -Strangs 7 von CadC (Abb. A3). Aufgrund seiner exponierten Lage am Übergang zwischen der DNA-Bindedomäne und der zytoplasmatischen Linkerregion könnte dieser  $\beta$ -Strang in die Stabilisation bei der DNA-Bindung beteiligt sein. Die Auflösung der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> betrug 2,0 Ångström. Aus der Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren lag bisher keine Kristallstruktur eines DNA-Bindemotivs vor. Die Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> zeigte, wie auch die NMR-Struktur, ein „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv aus der Familie der OmpR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren (Abb. 38 B). Zu der Familie der OmpR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren zählen neben CadC und PhoB aus *E. coli* auch ToxR aus *V. cholerae* (Mf102 -Hackert & Stock 1997). Die Mitglieder der OmpR-Familie teilen einen

ähnlichen strukturellen Aufbau, jedoch unterscheiden sie sich in den Mechanismen der Transkriptionsaktivierung (Blanco *et al.* 2002). Die Struktur der zytoplasmatischen DNA-bindenden Domäne konnte sowohl für OmpR mit 1,95 Å (Martínez-Hackert & Stock 1997) als auch für PhoB mit 2,0 Å (Blanco *et al.* 2002) geklärt werden. Der Vergleich der Röntgenstruktur und der NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub> zeigte eine hohe Übereinstimmung in allen strukturgebenden Bereichen (Abb. 38 C). Die Struktur von PhoB, einem weiteren Mitglied der OmpR-ähnlichen Regulatoren, konnte im Komplex mit DNA (23 bp) mit einer Auflösung von 2,5 Å gelöst werden (Blanco *et al.* 2002). Im Modell aus der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> mit PhoB-spezifischer DNA interagiert die Helix  $\alpha_3$  mit der großen Furche der DNA, das „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv wird von den Helices  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  und der dazwischenliegenden  $\alpha$ -Schleife gebildet (Abb. 38 D). In PhoB sorgen weitere Linkerregionen des Bindemotives für die korrekte Positionierung des DNA-Bindemotives zur RNA-Polymerase (Blanco *et al.* 2002).



**Abb. 38: Struktur der DNA-Bindedomäne (CadC<sub>1-107</sub>).** **A**, NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub>. Die derzeitige Qualität der Konvergenz der NMR-Struktur von CadC<sub>1-107</sub> liegt bei 0,46 backbone RMSD. **B**, Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> mit einer Auflösung von 2,0 Å. **C**, Überlagerung der NMR- (grün) und der Kristallstruktur (blau) von CadC<sub>1-107</sub>. Es wurden die 20 energieärmsten NMR-Strukturen ausgewählt. **D**, Überlagerung der Kristallstrukturen aus CadC (blau) und PhoB (gelb) im Komplex mit PhoB-spezifischer DNA (grau). Alle Abbildungen wurden mit dem Programm Pymol (DeLano 2002) erstellt. Dargestellt ist jeweils die komplette Struktur.

## 6.5 Aminosäurereste in der Erkennungshelix sind in die DNA-Bindung involviert

Um die Frage zu beantworten, welche Aminosäurereste der zytoplasmatischen Domäne in CadC an der Bindung an den *cadBA*-Promotor beteiligt sind, wurden zahlreiche CadC-Varianten mit einfachen Aminosäureaustauschen *in vivo* hinsichtlich der Auswirkungen auf die DNA-Bindung analysiert. Basierend auf dieser detaillierten Mutagenesestudie wurde

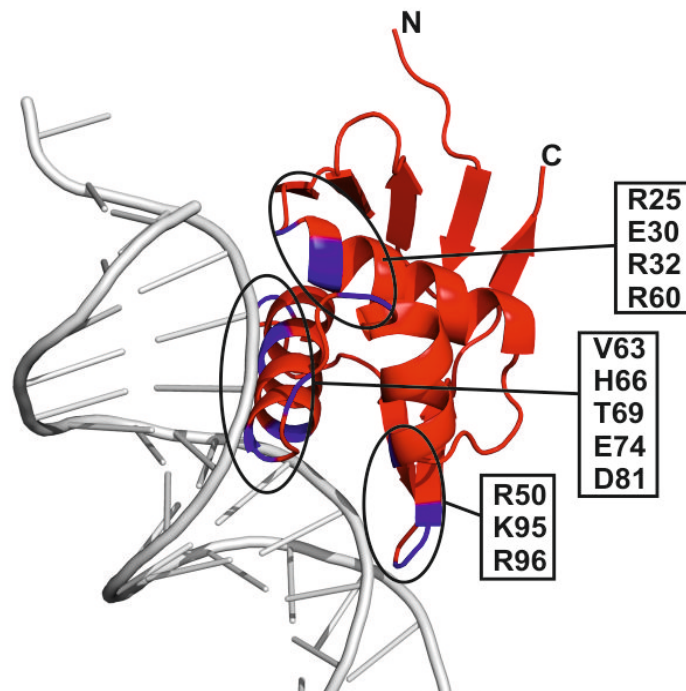
beobachtet, dass die Seitenketten von R25, E30, R32, R50, R60, V63, H66, T69, D81, K95 und R96 essentiell für die Bindung an die DNA waren, während die Seitenketten R7, E10, R22, E46, E52, N65, E74, N82, D83A, E84, D85 und Y98 keine Protein-DNA-Interaktion vermittelten.

- Computergestützte Modellierungsstudien der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> auf PhoB-spezifischer DNA (Blanco *et al.* 2002) ließen genauere Beobachtungen zur Lokalisation der Aminosäurereste R25, E30, R32, R50, R60, V63, H66, T69, D81, K95 und R96 zu. Alle oben genannten Aminosäuren waren in einem Modell aus der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> mit dem *phoB*-Promotor der DNA zugewandt (Abb. 39). Die *pho*-Box stellt die spezifische DNA-Sequenz für PhoB dar und besteht aus zwei direkten Wiederholungssequenzen (11 bp). PhoB bindet als Dimer an DNA, wobei je eine Wiederholungseinheit von einem PhoB-Monomer besetzt wird. Nach Bindung von PhoB wird die  $\sigma^{70}$ -Untereinheit der RNAP rekrutiert und die Transkription initiiert.
- H66 und T69 sind in CadC in Helix  $\alpha 3$  lokalisiert, diese interagiert in PhoB mit der großen Furche der DNA (Blanco *et al.* 2002). In PhoB wurde der Aminosäurerest R193 als Kontaktstelle des Proteins mit der großen Furche DNA beschrieben (Blanco *et al.* 2002). In CadC ist an dieser Stelle des Proteins H66 lokalisiert, dessen Seitenkette ebenfalls Interaktion mit der DNA vermitteln könnte. Auch ist T69 in CadC optimal für Protein-DNA-Interaktionen positioniert, in PhoB liegt an dieser Position ein Aminosäurerest (V197) der mittels Van-der-Waals-Wechselwirkungen Interaktion mit der DNA vermittelt (Blanco *et al.* 2002). Das Modell der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> an PhoB-spezifischer DNA (*pho*-Box) zeigte, dass auch in CadC die Interaktion mit der großen Furche der DNA über die Helix  $\alpha 3$  vermittelt wird (Abb. 39). Große Unterschiede in der chemischen Verschiebung in NMR-Spektroskopie-Analysen bestätigten eine potentielle Rolle der Aminosäuren H66-E74 in die Bindung an die DNA.
- Obwohl die Aminosäure E74 in der Erkennungshelix  $\alpha 3$  von CadC in NMR-Messungen nach DNA-Zugabe große Unterschiede in der chemischen Verschiebung zeigte, konnte in vivo keine Auswirkung auf die DNA-Bindung detektiert werden. Die Seitenkette von E74 zeigt, basierend auf den Modellierungsstudien der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> auf PhoB-spezifischer DNA, in die große Furche der DNA, jedoch ist die Ausrichtung der Seitenkette für eine Interaktion mit der DNA nicht prädestiniert. In PhoB ist an dieser Position des Proteins die Aminosäure Arginin (R201) lokalisiert.

Die Seitenkette von R201 in PhoB kann direkten Kontakt zur *pho*-Box aufnehmen (Blanco *et al.* 2002).

- R60 und V63 sind in einer Schleife N-terminal zu Helix  $\alpha 3$  lokalisiert. Diese  $\alpha$ -Schleife ist in die Interaktion mit der RNAP involviert, für PhoB wurde auch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen E191, in der  $\alpha$ -Schleife lokalisiert, und der DNA beschrieben (Blanco *et al.* 2002). V63 könnte aufgrund der prädestinierten Lage im Modell Protein-DNA-Interaktion vermitteln (Abb. 39).
- Interaktion mit der kleinen Furche der DNA könnte durch die CadC-Aminosäurereste K95 und R96 vermittelt werden, die in einer Schleife und dem Beginn eines  $\beta$ -Strangs lokalisiert sind (Abb. 39). Protein-DNA-Interaktion mit der kleinen Furche der DNA wird in PhoB ebenfalls über einen  $\beta$ -Strang, insbesondere über R219, vermittelt. R219 zeichnet sich durch einen hohen Grad an Flexibilität aus und wird durch Interaktion mit dem *phoB*-Promotor stabilisiert (Blanco *et al.* 2002).
- Die Aminosäure E30 in CadC liegt in einer N-terminalen Schleife (Abb. 39) und tritt im Modell der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> auf PhoB-spezifischer DNA in direkten Kontakt mit dem DNA-Rückgrat. Die Substitution von Glutamat zu Aspartat an Position 30 in CadC resultierte in einem inaktiven Protein. Wurde Glutamat zu Alanin oder Arginin substituiert, so wurde die *cadBA*-Expression unabhängig vom pH-Stimulus komplementiert. In vivo und in vitro Experimente bestätigten eine gesteigerte Affinität der Variante CadC\_E30R zum *cadBA*-Promotor.
- Aminosäure R50 ist in CadC zu Beginn der Helix  $\alpha 2$  lokalisiert und aufgrund der Lage vermutlich nicht in die DNA-Bindung involviert (Abb. 39). Auch die Aminosäurereste R25, am Anfang eines  $\beta$ -Strangs lokalisiert, und R32, in Helix  $\alpha 1$  lokalisiert, können vermutlich aufgrund der Lage und Ausrichtung ihrer Seitenketten keine DNA-Kontakte vermitteln (Abb. 39).
- CadC\_D81 liegt in einer C-terminalen Schleife neben der Erkennungshelix und kann im Modell mit der *pho*-Box keinen Kontakt zur DNA herstellen. Die Substitution von Aspartat zu Alanin an Position 81 in CadC resultierte in einem inaktiven Protein. Wurde Aspartat zu Asparagin an Position 81 in CadC substituiert, so konnte *cadBA*-Expression komplementiert werden. Vorstellbar wäre, dass es nach Detektion des pH-Signals zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domäne kommt. Strukturelle Veränderungen in CadC\_D81A könnten die Intradomänenveränderung stören. Auch für PhoB konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindedomäne nach der

Wahrnehmung des Stimulus (niedrige Phosphatkonzentration) konformationellen Änderungen unterliegt (Blanco *et al.* 2002).



**Abb. 39: Lokalisation der Aminosäurepositionen in der Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> im 3D-Homologiemodell mit PhoB-spezifischer DNA (*pho* Box), die mittels zielgerichteter Mutagenese identifiziert wurden.** Die potentiellen zytoplasmatischen Interaktionsstellen H66, T69 und E74 befinden sich innerhalb der Erkennungshelix ( $\alpha 3$ ). V63 und D81 liegen in benachbarten naheliegenden Schleifen. Auch das Cluster R22, E30, R32 und R60 sowie das Cluster R50, K95 und R96 können potentiell mit der DNA interagieren. Die Kristallstruktur von CadC<sub>1-107</sub> ist in rot, PhoB-spezifische DNA ist in grau dargestellt. Die Aminosäurepositionen der zielgerichteten Mutagenese sind blau markiert. N: N-Terminus, C: C-Terminus.

## 6.6 Permanente DNA-Bindung von CadC

Es konnte gezeigt werden, dass CadC stromaufwärts der -35/-10 Box des *cadBA*-Promotors bindet. Zudem wurde in früheren Gel-Retardationsexperimenten gezeigt, dass CadC mit 5-10 fach niedrigeren Affinitäten unspezifisch an DNA bindet als an spezifische DNA. Damals wurde die Transmembrantopologie von CadC für die geringen Unterschiede zwischen spezifischer und unspezifischer DNA-Bindung verantwortlich gemacht, da in Phospholipiden rekonstruiertes CadC nicht in das Gel einläuft und somit auch Protein-DNA-Komplexe in den Taschen verbleiben (Küper 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von löslichen CadC-Varianten an spezifische und unspezifische DNA mit Hilfe von in vitro Gel-



Retardationsexperimenten, SPR- und NMR-Spektroskopie-Messungen untersucht. Die Bindung von allen untersuchten CadC-Varianten an das *cadBA*-Promotorfragment war vergleichbar mit WT-CadC. Jedoch war die Affinität der CadC-Varianten zu unspezifischer DNA vergleichbar mit der Affinität zu spezifischer DNA und die Affinität der löslichen Varianten zu unspezifischer DNA war höher als die Affinität von WT-CadC zu unspezifischer DNA. Als Ursache für diese Befunde können verschiedene Parameter betrachtet werden:

- Kurzzeitig wurde eine Arbeitshypothese vertreten, die eine proteolytische Prozessierung von CadC favorisiert. So findet in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* eine proteolytische Spaltung von CadC statt (Lee *et al.* 2013). Auch RseA aus *E. coli* wird im Zuge der Signaltransduktion proteolytisch gespalten (Hizukuri & Akiyama 2012). CadC liegt Membran-integriert vor und kann daher nicht durch freie Diffusion die *cadBA*-Promotorregion finden. Eine räumliche Nähe von CadC zur *cadBA*-Promotorregion könnte trotz Membranintegration eine Bindung ermöglichen (Neely & Olson 1996). Die Bindung an DNA könnte durch proteolytische Abspaltung der N-terminalen Domäne von CadC erfolgen. Versuche zur Lokalisation von *cadC* zu  $P_{cadBA}$  konnten eine Rolle der räumlichen Nähe von CadC zur *cadBA*-Promotorregion nicht bestätigen. Dennoch erscheint eine proteolytische Spaltung von CadC in *E. coli* als Aktivierungsmechanismus unwahrscheinlich. Zum einen widerspricht die unspezifische Bindung von löslichen CadC-Varianten an DNA dieser Hypothese, zum anderen konnten lösliche CadC-Varianten die *cadBA*-Expression nicht induzieren. Das Auftreten eines Abspaltungsprodukts von CadC (etwa 20-25 kDa) bei der  $Ni^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie von His<sub>10</sub>-CadC als Resultat der proteolytischen Spaltung konnte mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen widerlegen werden. Außerdem gelang es nie, die N-terminale Domäne von CadC löslich im Zytoplasma zu detektieren (Küper 2005). Auch ist Cadaverin als Inhibitor für CadC beschrieben ist (Fritz *et al.* 2009) und proteolytisch prozessiertes CadC könnte diesen Feedback-Mechanismus nicht vermitteln.
- Für den Transkriptionsregulator OxyR aus *E. coli*, welcher  $H_2O_2$  sensiert, konnte ein neuer Regulationsmechanismus detektiert werden. Dieser Mechanismus beruht auf einen Redoxswitch, in der oxidierten Form findet die Formierung einer Disulfidbrücke statt, dies führt zu Konformationsänderungen innerhalb des Proteins. Dadurch wird die Interaktion mit der RNAP ermöglicht und die Transkription findet statt. Auch in der reduzierten Form bindet OxyR an DNA, ohne die Formierung der Disulfidbrücke kann jedoch trotz der Interaktion mit der DNA keine Interaktion mit der RNAP stattfinden (Choi *et al.* 2001).

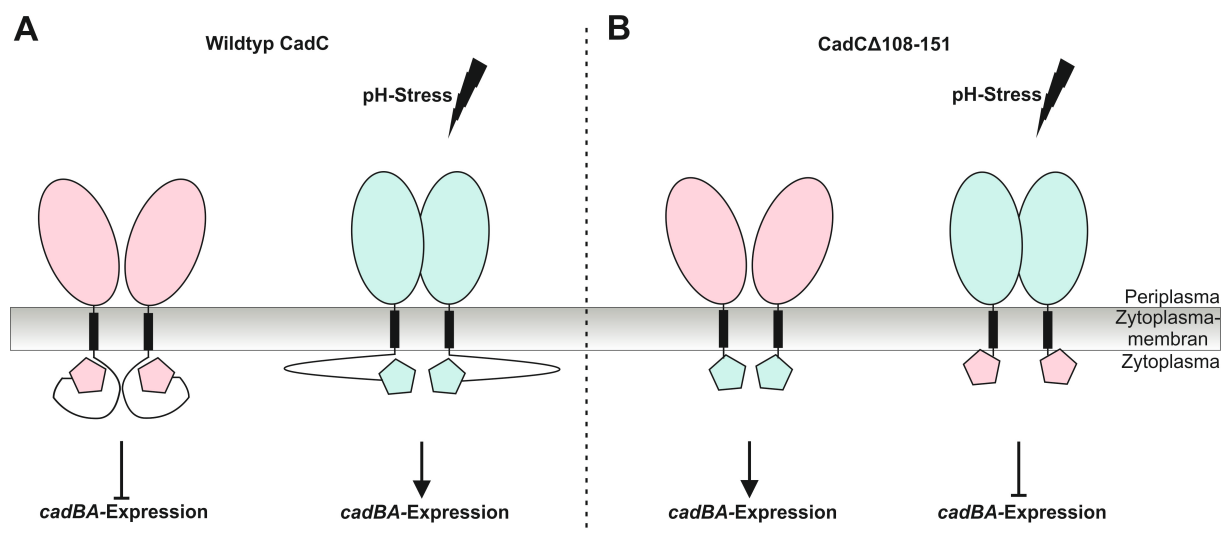
Eine derartige transiente Stimulus-abhängige Interaktion mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP wäre auch für CadC vorstellbar. So ist nicht die Affinität zur DNA, sondern die Interaktion von CadC mit der RNAP essentiell für die Aktivierung des *cadBA*-Operons. SPR-Experimente sollten Aufschluss über die Interaktion zwischen der RNAP und CadC-Varianten bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 6,0 und pH 7,4) geben. Interessanterweise war die Interaktion von CadC und CadC $\Delta$ 108-151 mit der RNAP bei niedrigem pH-Wert stärker als bei physiologischem pH-Wert. Sind *E. coli* Zellen einem saurem Milieu ausgesetzt, so fällt der zytoplasmatische pH-Wert kurzzeitig auf Werte von pH 6,2 bis pH 6,8 (Martinez *et al.* 2012). Allerdings war die Bindung der RNAP an P<sub>*cadBA*</sub> nicht von der Anwesenheit von CadC abhängig.

- Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erzielten Resultate wird ein Modell der permanenten Bindung von CadC an die *cadBA*-Promotorregion favorisiert. In SPR-Messungen konnte eine sehr geringe Dissoziation von CadC und CadC-Varianten von der DNA beobachtet werden. Diese Beobachtung spricht für eine sehr starke Bindung des Proteins an die DNA und stützt das Modell der permanenten Bindung von P<sub>*cadBA*</sub> durch CadC. Auch konnte eine proteolytische Prozessierung von CadC im Rahmen dieser und auch in früheren Arbeiten (Küper 2005) ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde bereits für andere Proteine aus *E. coli* eine permanente Bindung an die DNA detektiert. Neben OxyR aus *E. coli* bindet auch der Sensor SoxR aus *E. coli* in reduzierter und oxidierte Form an die *soxS*-Promotorregion. Jedoch ermöglicht nur die oxidierte Form von SoxR die Formierung eines aktiven Komplexes mit der RNAP und die Expression des Transkriptionsfaktors SoxS findet statt (Ding *et al.* 1996).

Des Weiteren wurde die Affinität der CadC-Varianten CadC<sub>1-159</sub>\_E30R (konstitutiv aktiv im *in vivo* Test) und CadC<sub>1-159</sub>\_R96A (inaktiv im *in vivo* Test) zum *cadBA*-Promotor *in vitro* mittels SPR-Messungen analysiert. Die Affinität von CadC<sub>1-159</sub>\_E30R zu spezifischer DNA war deutlich stärker als von CadC<sub>1-159</sub> zu spezifischer DNA. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass CadC<sub>1-159</sub>\_R96A schwächer als CadC<sub>1-159</sub> mit dem *cadBA*-Promotor interagiert. Die Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen auf Protein-DNA-Interaktionen wurden auch in früheren Arbeiten beschrieben. So ist bekannt, dass die Affinität der Variante H-NS\_D68V\_D71V zu dem *hns*-Promotor in Gelretardationsexperimenten deutlich geringer ist als die Affinität des Wildtyp-Proteins H-NS zu dem *hns*-Promotor. Aufgrund dieser Resultate wurde angenommen, dass die Anwesenheit der hydrophoben Valinreste in H-NS die Oligomerisierung des Proteins begünstigt und dadurch Regulation der Genexpression erzielt wird (Giangrossi *et al.* 2014).

## 6.7 Der Linker beeinflusst die Disposition der DNA-Bindedomänen im CadC-Dimer nach Reizwahrnehmung

Die Rolle unstrukturierter Linkerregionen in der Oligomerisierung von Proteindomänen für die Signaltransduktion in Prokaryoten ist bekannt (Little *et al.* 2012). Für CadC wurde kürzlich gezeigt, dass sich die Dimerisierung im Periplasma des Proteins ereignet (Eichinger *et al.* 2011; Lindner & White 2014). Mittels SLS-Messungen wurde die Fähigkeit der zytoplasmatischen Linkerregion in CadC zur Oligomerisierung der zytoplasmatischen Domäne untersucht. Sowohl CadC<sub>1-107</sub> (DNA-Bindedomäne) als auch CadC<sub>1-159</sub> (DNA-Bindedomäne und Linkerregion) wurden als Monomer detektiert und die Linkerregion hatte keinen Einfluss auf die Oligomerisierung der zytoplasmatischen Domäne in CadC.



**Abb. 40: Modell für CadC-vermittelte Signaltransduktion nach konformationellen Veränderungen in der periplasmatischen Domäne.** Der Transkriptionsregulator CadC ist aus einer periplasmatischen Sensordomäne (*ON-State*: grün; *OFF-State*: rot), einer einzelnen Transmembrandomäne (schwarz), einem zytoplasmatischen Linker (schwarze Linie) und einer DNA-Bindedomäne (*ON-State*: grün; *OFF-State*: rot), aufgebaut. **A**, Wildtyp CadC aktiviert die *cadBA*-Expression nach Reizwahrnehmung durch die periplasmatische Domäne. Konformationsänderungen im zytoplasmatischen Linker positionieren die DNA-Bindedomänen zueinander (*ON-State*). **B**, CadCΔ108-151 induziert die *cadBA*-Expression ohne pH-Stress. Die Verkürzung des zytoplasmatischen Linkers forciert einen *ON-State* bei physiologischen pH-Werten. Bei niedrigen pH-Werten führt die Wahrnehmung des Stimulus durch die periplasmatische Domäne zu Konformationsänderungen, welche auf die DNA-Bindedomäne übertragen werden und resultiert in einem *OFF-State*.

Um die Rolle des zytoplasmatischen CadC-Linkers in der Positionierung der DNA-Bindedomäne zu untersuchen, wurde die Oligomerisierung von CadC analysiert. Interessanterweise implizieren die Daten zur durchgeführten BACTH-Interaktionsstudie eine pH-abhängige Interaktion zwischen CadC-Monomeren. Starke CadC/CadC-Interaktion konnte bei induzierenden Bedingungen (niedrige pH-Werte und Anwesenheit von Lysin) ab einem Schwellenwert kleiner als pH 6,6 und nicht bei physiologischen pH-Werten festgestellt werden. Dies steht im Einklang damit, dass auch CadC-abhängige CadA-Aktivität nicht bei pH-Werten größer als pH 6,8 induziert wurde (Fritz *et al.* 2009). CadC-Homodimerisierung ereignet sich unter pH-Stress und die Homodimerisierung von CadC ist die Voraussetzung für die enzymatische Aktivität von CadA. Da die Deletion des CadC-Linkers (CadC $\Delta$ 108-151) in inverser *cadBA*-Expression zum Wildtyp resultierte, wurde diese CadC-Variante ebenfalls mit Hilfe einer BACTH-Interaktionsstudie analysiert und ein zum Wildtyp invertiertes Interaktionsprofil für T18-CadC $\Delta$ 108-151 und T25-CadC $\Delta$ 108-151 detektiert. Starke T18-CadC $\Delta$ 108-151/T25-CadC $\Delta$ 108-151-Interaktion wurde bei physiologischen pH-Werten beobachtet, erfährt jedoch eine deutliche Abschwächung bei niedrigen pH-Werten. In DesK, eine Histidinkinase in *Bacillus subtilis*, wird Signaltransduktion durch den Wechsel zweier Konformationen vermittelt (Inda *et al.* 2014). Die Integration aller aktuellen Ergebnisse postuliert das Modell der permanenten DNA-Bindung, in welchem ein niedriger externer pH zu konformationellen Änderungen in der periplasmatischen Domäne und anschließend im zytoplasmatischen Linker führt. Dies ermöglicht die korrekte Positionierung der DNA-Bindedomänen im CadC-Dimer zur DNA und führt zur Aktivierung des *cadBA*-Operons (Abb. 40 A). Die Ansäuerung der Umgebung der Zelle führt zur Protonierung von negativ geladenen Aminosäuren an der Grenzfläche des CadC-Dimers in der periplasmatischen Domäne (Haneburger *et al.* 2011). Die Protonierung der negativ geladenen Aminosäuren stabilisiert die Dimerisierung von Wildtyp CadC und führt im Zytoplasma zu strukturellen Veränderungen des Linkers. Dadurch könnte die Homodimerisierung der DNA-Bindedomäne stimuliert werden und anschließend *cadBA*-Expression ermöglicht werden (Abb. 40 A). In CadC $\Delta$ 108-151 mit verkürzter Linkerregion findet *cadBA*-Expression und Homodimerisierung bei neutralen Bedingungen statt. Der fehlende zytoplasmatische Linker forciert in CadC artifizielle Dimerisierung und einen An-Zustand des Proteins bei neutralen Bedingungen. Nach Wahrnehmung des externen Reizes im Periplasma wirkt der saure pH-Stimulus diesem Zustand entgegen und *cadBA*-Expression ist nicht möglich (Abb. 40 B). Der CadC-Linker überträgt die Konformation der periplasmatischen Domäne zur DNA-Bindedomäne und die Verkürzung des Linkers führt zu einer Fehlinterpretation des Signals.

Die Übertragung des Signals ist jedoch nicht abhängig von Aminosäuresubstitutionen oder der Verlängerung des Linkers. Es ist nachvollziehbar, dass Variation der Linkerlänge in verschiedenen Organismen notwendig ist, um unterschiedliche Abstände zwischen DNA und Zytoplasmamembran zu überbrücken. Die Flexibilität des Linkers kann diese Verbindung ermöglichen und die Positionierung der DNA-Bindedomänen aufeinander abzustimmen.

## 7 Ausblick

Trotz der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der zur Aktivierung der *cadBA*-Transkription durch CadC führt, sind zum besseren Verständnis weitere Untersuchungen notwendig. Der biologischen Funktion von unstrukturierten Proteinen wurde in der Vergangenheit wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Das Verständnis wie strukturell ungeordnete Proteinregionen Funktionalität vermitteln, stellt eines der Ziele für die Zukunft dar. So wird in CadC eine Rolle der Linkerregion in der korrekten Positionierung der DNA zum *cadBA*-Promotor postuliert. Dafür wäre eine Stimulus-abhängige Konformationsänderung innerhalb der zytoplasmatischen Domäne nötig. Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der kompletten Struktur von CadC im Komplex mit DNA könnte Hinweise auf eine veränderte Positionierung der DNA-Bindedomäne zur DNA in Abhängigkeit des externen Stimulus liefern. Jedoch hat die Kristallisation von Membranproteinen eine deutlich verringerte Erfolgsrate als die Kristallisation von löslichen Proteinen. Besonders unstrukturierte Proteinregionen stellen ein Hindernis für die Kristallisation dar. Mittels der Fusion von CadC mit einem Affinitäts-Tag, wie MBP (*maltose binding protein*) oder Trx (Thioredoxin), könnte eine Stabilisation des Proteins für die Reinigung erzielt werden. Auch die CadC-Variante mit verkürzter Linkerregion (CadC-Δ108-151) könnte aufgrund der kompakten Sekundärstruktur für die Röntgenkristallographie herangezogen werden. NMR-Spektroskopie-Messungen sind für die Strukturaufklärung der kompletten Struktur von CadC weniger geeignet, da die molekulare Größe eines CadC/DNA-Komplexes die gängigen Größenbegrenzungen der NMR-Spektroskopie (>30 kDa) überschreitet. Jedoch ermöglicht die Bereitstellung des neuen 1,2 GHz NMR-Spektrometers am Institut für biomolekulare NMR-Spektroskopie der Technischen Universität München zukünftig auch die Messung von größeren dynamischen Molekülen durch Verbesserung der Sensitivität. Eine weitere Aufgabe des zytoplasmatischen Linkers könnte die Interaktion mit weiteren Bereichen von CadC darstellen. So ist es vorstellbar, dass hydrophile Aminosäurereste der zytoplasmatischen Domäne in CadC mit der Membran interagieren könnten. Die Interaktion des zytoplasmatischen Linkers mit der Transmembrandomäne oder der DNA-Bindedomäne von CadC wäre durch BACTH-Experimente realisierbar. Für die Transkriptionsaktivierung von *cadBA* spielt die Homooligomerisierung von CadC/CadC eine Rolle (Rauschmeier *et al.* 2014). Elektronenspinresonanz-Messungen mit Spin-markierten Cysteinen in CadC könnten Aufschluss über einen Wechsel vom CadC-Monomer zum CadC-

Dimer geben und somit Dynamiken von CadC nach Reizwahrnehmung im Periplasma zeigen. Um zu verstehen, wie sich die einzelne Zelle bei Bedingungen eines moderaten Säurestress verhält, muss die Verteilung der Komponenten des Cad-Systems in der Gesamtzellpopulation analysiert werden. In der Vergangenheit wurden bereits auf chromosomaler Ebene fluoreszierende CadA-, CadB- und LysP-Hybridproteine generiert. Während alle verfügbaren LysP-Hybride ohne die Anwesenheit von Lysin konstitutiv exprimiert wurden, zeigte sich eine heterogene Verteilung von CadA und CadB. Chromosomale fluoreszierende CadC-Fusionen sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht verfügbar gewesen, sie sind allerdings essentiell, um die Verteilung des Transkriptionsregulators zu untersuchen. Es wird spekuliert, dass der Lysin/Cadaverin-Antiport bei homogener Verteilung von CadB zum Erliegen kommen könnte, da der Export von Cadaverin von einem Konzentrationsgradienten über die Membran abhängig ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, müsste CadB bezüglich der Lysin/Cadaverin-Transportaktivität untersucht werden und der zeitliche Verlauf der externen Lysinkonzentration bei konstitutiv exprimierten *cadB* beobachtet werden.

## 8 Literatur

- Adzhubei, A., M. Sternberg & A. Makarov. 2013. Polyproline-II helix in proteins: structure and function. *J. Mol. Biol.* 425.2100-32.
- Airola, M., K. Watts, A. Bilwes & B. Crane. 2010. Structure of concatenated HAMP domains provides a mechanism for signal transduction. *Structure* 18.436-48.
- Aoki, H., S. Adams, D. Chung, M. Yaguchi, S. Chuang & M. Ganoza. 1991. Cloning, sequencing and overexpression of the gene for prokaryotic factor EF-P involved in peptide bond synthesis. *Nucleic Acids Res.* 19.6215-20.
- Applebaum, D., J. Dunlap & D. Morris. 1977. Comparison of the biosynthetic and biodegradative ornithine decarboxylases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 16.1580-84.
- Aravind, L. & C. Ponting. 1999. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 176.111-16.
- Auger, E. & G. Bennett. 1989. Regulation of lysine decarboxylase activity in *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* 151.466-68.
- Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith & K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*: Wiley, New York, NY.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. Datsenko, M. Tomita, B. Wanner & H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Sys. Biol.* 2.
- Bakker, E. & W. Mangerich. 1981. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* 147.820-26.
- Bearson, S., B. Bearson & J. W. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS microbiol. lett.* 147.173-80.
- Blanco, A., M. Sola, F. Gomis-Rüth & M. Coll. 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* 10.701-13.
- Blattner, F., G. Plunkett, C. Bloch, N. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. Glasner, C. Rode & G. Mayhew. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277.1453-62.
- Bloembergen, N., E. Purcell & R. Pound. 1948. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys. Rev.* 73.679.
- Blum, H., H. Beier & H. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8.93-99.
- Brooker, D., M. Lund & D. Blazevic. 1973. Rapid test for lysine decarboxylase activity in *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 26.622.
- Brown, J., T. Ross, T. McMeekin & P. Nichols. 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 37.163-73.
- Callahan, D., W. Liu, X. Li, M. Dreher, W. Hassouneh, M. Kim, P. Marszalek & A. Chilkoti. 2012. Triple stimulus-responsive polypeptide nanoparticles that enhance intratumoral spatial distribution. *Nano Lett.* 12.2165-70.
- Casadaban, M. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104.541-55.
- Castanie-Cornet, M., T. Penfound, D. Smith, J. Elliott & J. Foster. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181.3525-35.
- Cavanagh, J. 2007. *Protein NMR Spectroscopy – Principles and Practice*. Amsterdam: Elsevier 2nd edition.753ff.



- Chang, Y., A. Wang & J. Cronan. 1994. Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*) gene. *Mol. Microbiol.* 11.1019-28.
- Choi, H., S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz & S. Ryu. 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105.103-13.
- Daamen, W., JH. Veerkamp, JCM. Van Hest & T. Van Kuppevelt. 2007. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* 28.4378-98.
- DeLano, W. 2002. The PyMOL molecular graphics system.
- Dell, Cheryl L, Melody N Neely & Eric R Olson. 1994. Altered pH lysine signalling mutants of *cadC*, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli cadBA* operon. *Mol. Microbiol.* 14.7-16.
- Ding, H., E. Hidalgo & B. Dimple. 1996. The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J. Biol. Chem.* 271.33173-75.
- Dunker, A., C. Brown, J. D. Lawson, L. M. Iakoucheva & Z. Obradovic. 2002. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41.6573-82.
- Dyson, H J. & P. Wright. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6.197-208.
- Dziejman, M., H. Kolmar, H. Fritz & J. Mekalanos. 1999. ToxR co-operative interactions are not modulated by environmental conditions or periplasmic domain conformation. *Mol. Microbiol.* 31.305-17.
- Egan, S., S. James & S. Kjelleberg. 2002. Identification and characterization of a putative transcriptional regulator controlling the expression of fouling inhibitors in *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68.372-78.
- Eichinger, A., I. Haneburger, C. Koller, K. Jung & A. Skerra. 2011. Crystal structure of the sensory domain of *Escherichia coli* CadC, a member of the ToxR-like protein family. *Protein Sci.* 20.656-69.
- Epstein, W. & B. Kim. 1971. Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 108.639-44.
- Farrow, N., R. Muhandiram, A. Singer, S. Pascal, C. Kay, G. Gish, S. Shoelson, T. Pawson, J. Forman-Kay & L. Kay. 1994. Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by <sup>15</sup>N NMR relaxation. *Biochemistry* 33.5984-6003.
- Foster, J. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* 2.898-907.
- Fried, L., J. Lassak & K. Jung. 2012. A comprehensive toolbox for the rapid construction of *lacZ* fusion reporters. *J. Microbiol. Methods* 91.537-43.
- Fritz, G., C. Koller, K. Burdack, L. Tetsch, I. Haneburger, K. Jung & U. Gerland. 2009. Induction kinetics of a conditional pH stress response system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 393.272-86.
- Gajiwala, K. & S. Burley. 2000. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* 295.605-12.
- Gale, E. F & H. Epps. 1942. The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*) and the biological significance of the changes produced. *Biochem. J.* 36.600.
- Gardner, K., D. Moore & H. Erickson. 2013. The C-terminal linker of *Escherichia coli* FtsZ functions as an intrinsically disordered peptide. *Mol. Microbiol.* 89.264-75.
- Giangrossi, M., K. Wintraecken, R. Spurio & R. de Vries. 2014. Probing the relation between protein-protein interactions and DNA binding for a linker mutant of the bacterial nucleoid protein H-NS. *BBA - Proteins and Proteom.* 1844.339-45.

- Gil-Caballero, S., A. Favier & B. Brutscher. 2014. HNCA+, HNCOC+, and HNCACB+ experiments: improved performance by simultaneous detection of orthogonal coherence transfer pathways. *J. Biomol. NMR* 60.1-9.
- Glick, B. & M. C. Ganoza. 1975. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72.4257-60.
- Güntert, P. 2004. Automated NMR structure calculation with CYANA. *Protein NMR Techniques*, 353-78: Springer.
- Guo, X. 2012. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *J. Biophotonics* 5.483-501.
- Haas, B., J. Matson, V. DiRita & J. Biteen. 2014. Single-molecule tracking in live *Vibrio cholerae* reveals that ToxR recruits the membrane-bound virulence regulator TcpP to the *toxT* promoter. *Mol. Microbiol.*
- Haneburger, I., A. Eichinger, A. Skerra & K. Jung. 2011. New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 286.10681-89.
- Haneburger, I., G. Fritz, N. Jurkschat, L. Tetsch, A. Eichinger, A. Skerra, U. Gerland & K. Jung. 2012. Deactivation of the *E. coli* pH stress sensor CadC by cadaverine. *J. Mol. Biol.* 424.15-27.
- Häse, C. & J. Mekalanos. 1998. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95.730-34.
- Hellman, L. & M. Fried. 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nat. Protocols* 2.1849-61.
- Hennig, J. & M. Sattler. 2014. The dynamic duo: combining NMR and small angle scattering in structural biology. *Protein Sci.* 23.669-82.
- Henry, J. & S. Crosson. 2011. Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* 65.261.
- Heydenreich, T. 2013. Structural investigations on the cytoplasmic domain of the transcriptional activator CadC from *E. coli*. Masterarbeit, Technische Universität München.
- Hizukuri, Y. & Y. Akiyama. 2012. PDZ domains of RseP are not essential for sequential cleavage of RseA or stress-induced  $\sigma^E$  activation in vivo. *Mol. Microbiol.* 86.1232-45.
- Ho, Y., L. Burden & J. Hurley. 2000. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.* 19.5288-99.
- Hulko, M., F. Berndt, M. Gruber, J. Linder, V. Truffault, A. Schultz, J. Martin, J. Schultz, A. Lupas & M. Coles. 2006. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* 126.929-40.
- Inda, M. E., M. Vandenbranden, A. Fernández, D. de Mendoza, J. Ruyschaert & L. Cybulski. 2014. A lipid-mediated conformational switch modulates the thermosensing activity of DesK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111.3579-84.
- Iyer, R., C. Williams & C. Miller. 2003. Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185.6556-61.
- Jones, D. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292.195-202.
- Jung, K., B. Tjaden & K. Altendorf. 1997. Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272.10847-52.
- Kanchan, K., J. Linder, K. Winkler, K. Hantke, A. Schultz & J. Schultz. 2010. Transmembrane signaling in chimeras of the *Escherichia coli* aspartate and serine chemotaxis receptors and bacterial class III adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 285.2090-99.
- Kanjee, U., I. Gutsche, E. Alexopoulos, B. Zhao, M. El Bakkouri, G. Thibault, K. Liu, S. Ramachandran, J. Snider & E. Pai. 2011. Linkage between the bacterial acid stress and

- stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *EMBO J.* 30.931-44.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann & D. Ladant. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95.5752-56.
- Kashiwagi, K., T. Suzuki, F. Suzuki, T. Furuchi, H. Kobayashi & K. Igarashi. 1991. Coexistence of the genes for putrescine transport protein and ornithine decarboxylase at 16 min on *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* 266.20922-27.
- Kay, L., D. Torchia & A. Bax. 1989. Backbone dynamics of proteins as studied by nitrogen-15 inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28.8972-79.
- Kibbe, W. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35.W43-W46.
- Kjaergaard, M., V. Iešmantavičius & F. Poulsen. 2011. The interplay between transient  $\alpha$ -helix formation and side chain rotamer distributions in disordered proteins probed by methyl chemical shifts. *Prot. Sci.* 20.2023-34.
- Knappe, T., B. Eckert, P. Schaarschmidt, C. Scholz & F. Schmid. 2007. Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J. Mol. Biol.* 368.1458-68.
- Kolibachuk, D. & EP. Greenberg. 1993. The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. *J. Bacteriol.* 175.7307-12.
- Kraxenberger, T. 2006. Zum Aktivierungsmechanismus des membranintegrierten Transkriptionsregulators CadC in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Krin, E., A. Danchin & O. Soutourina. 2010. Decrypting the H-NS-dependent regulatory cascade of acid stress resistance in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 10.273.
- Küper, C. 2001. Molekulare Analyse des Transkriptionsaktivators CadC von *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Küper, C. & K. Jung. 2006. CadC-mediated activation of the *cadBA* promoter in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10.26-39.
- Küper, Ch. 2005. Charakterisierung der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons durch den Transkriptionsregulator CadC aus *Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kwan, A., M. Mobli, P. Gooley, G. King & J. Mackay. 2011. Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. *FEBS J.* 278.687-703.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227.680-85.
- Larkin, M., G. Blackshields, N. Brown, R. Chenna, P. . McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. Wallace, A. Wilm & R. Lopez. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23.2947-48.
- Lassak, K., E. Peeters, S. Wróbel & S. Albers. 2013. The one-component system ArnR: a membrane-bound activator of the crenarchaeal archaellum. *Mol. Microbiol.* 88.125-39.
- Lee, J., D. Tomchick, C. Brautigam, M. Machius, R. Kort, K. Hellingwerf & K. Gardner. 2008. Changes at the KinA PAS-A dimerization interface influence histidine kinase function. *Biochemistry* 47.4051-64.
- Lee, Y. H., S. Kim, J. H. Kim, I. S. Bang, I. S. Lee, S. H. Bang & Y. K. Park. 2013. A phosphotransferase system permease is a novel component of CadC signaling in *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 338.54-61.
- Lemonnier, M. & D. Lane. 1998. Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiology* 144.751-60.

- Li, C., D. S. Merrell, A. Camilli & J. B. Kaper. 2002. ToxR interferes with CRP-dependent transcriptional activation of *ompT* in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 43.1577-89.
- Lin, L., H. Hasumi & J. Brandts. 1988. Catalysis of proline isomerization during protein-folding reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 956.256-66.
- Lindeman, L. & J. Adama. 1971. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. Chemical shifts for the paraffins through C9. *Anal. Chem.* 43.1245-52.
- Lindner, E. & S. White. 2014. Topology, dimerization, and stability of the single-span membrane protein CadC. *J. Mol. Biol.*
- Little, R., P. Slavny & R. Dixon. 2012. Influence of PAS domain flanking regions on oligomerisation and redox signalling by NifL. *PloS one* 7.e46651.
- Liu, Z. & Y. Huang. 2014. Advantages of proteins being disordered. *Prot. Sci.* 23.539-50.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193.265-75.
- Luger, K., A. Mäder, R. Richmond, D. Sargent & T. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389.251-60.
- MacKay, J. A., D. Callahan, K. FitzGerald & A. Chilkoti. 2010. Quantitative model of the phase behavior of recombinant pH-responsive elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules* 11.2873-79.
- Maniatis, T., E. Fritsch & J. Sambrook. 1989. *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press* New York.
- Martínez-Hackert, E. & A. Stock. 1997. The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure* 5.109-24.
- Martinez-Hackert, E. & A. Stock. 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* 269.301-12.
- Martinez, K., R. Kitko, J. P. Mershon, H. Adcox, K. Malek, M. Berkmen & J. Slonczewski. 2012. Cytoplasmic pH response to acid stress in individual cells of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* observed by fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 78.3706-14.
- Maurer, L., E. Yohannes, S. Bondurant, M. Radmacher & J. Slonczewski. 2005. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 187.304-19.
- McGinnis, S. & T. Madden. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32.W20-W25.
- McGuffin, L., K. Bryson & D. Jones. 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16.404-05.
- Meng, S. Y. & G. N. Bennett. 1992. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J. Bacteriol.* 174.2659-69.
- Merrell, D. S. & A. Camilli. 2000. Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the “ToxR-like” family of transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 182.5342-50.
- Meselson, M. & R. Yuan. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217.1110.
- Miller, J. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, V., R. Taylor & J. Mekalanos. 1987. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* 48.271-79.
- Møller, V. 1955. Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 36.158-72.
- Mondéjar, L., A. Lupas, A. Schultz & J. Schultz. 2012. HAMP domain-mediated signal transduction probed with a mycobacterial adenylyl cyclase as a reporter. *J. Biol. Chem.* 287.1022-31.

- Moreau, P. 2007. The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J. Bacteriol.* 189.2249-61.
- Mullis, K., R. Saiki, T. Bugawan, G. Horn & H. Erlich. 1986. Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324.163-66.
- Neely, M. N., C. L. Dell & E. R. Olson. 1994. Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli* cad operon. *J. Bacteriol.* 176.3278-85.
- Neely, M. N. & E. R. Olson. 1996. Kinetics of expression of the *Escherichia coli* cad operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* 178.5522-28.
- Oka, Y., T. Matsushita, N. Mochizuki, P. H. Quail & A. Nagatani. 2008. Mutant screen distinguishes between residues necessary for light-signal perception and signal transfer by phytochrome B. *PLoS Gen.* 4.e1000158.
- Ottemann, K. M. & J. J. Mekalanos. 1995. Analysis of *Vibrio cholerae* ToxR function by construction of novel fusion proteins. *Mol. Microbiol.* 15.719-31.
- Padmanabhan, S., S. Marqusee, T. Ridgeway, T. M. Laue & R. L. Baldwin. 1990. Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids. *Nature*.
- Park, H. & M. Inouye. 1997. Mutational analysis of the linker region of EnvZ, an osmosensor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179.4382-90.
- Parkinson, J. S. & E. C. Kofoed. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Gen.* 26.71-112.
- Peterson, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83.346-56.
- Phan, A. P. H., T. T. Ngo & H. M. Lenhoff. 1982. Spectrophotometric assay for lysine decarboxylase. *Anal. Biochem.* 120.193-97.
- Promega. 1994. Technical manual: Altered sites II in vitro mutagenesis systems.
- Quistgaard, E. M., P. Nordlund & C. Löw. 2012. High-resolution insights into binding of unfolded polypeptides by the PPIase chaperone SlpA. *FASEB J.* 26.4003-13.
- Radhakrishnan, I., G. C. Pérez-Alvarado, H. J. Dyson & P. E. Wright. 1998. Conformational preferences in the Ser 133-phosphorylated and non-phosphorylated forms of the kinase inducible transactivation domain of CREB. *FEBS Lett.* 430.317-22.
- Rausch, C. 2013. Zur Funktion des unstrukturierten Bereichs der zytoplasmatischen Domäne des membranintegrierten Transkriptionsaktivators CadC. Bachelorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Rauschmeier, M. 2014. Funktion des Lysintransporters LysP von *Escherichia coli* in Transport und Regulation. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Rauschmeier, M., V. Schüppel, L. Tetsch & K. Jung. 2014. New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 426.215-29.
- Rhee, J., J. Rhee, P. Youl Ryu & S. Ho Choi. 2002. Identification of the *cadBA* operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 208.245-51.
- Richard, H. & J. W. Foster. 2004. *Escherichia coli* glutamate-and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J. Bacteriol.* 186.6032-41.
- Rigaud, J., B. Pitard & D. Levy. 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1231.223-46.
- Rippa, V., C. Cirulli, B. Di Palo, N. Doti, A. Amoresano & A. Duilio. 2010. The ribosomal protein L2 interacts with the RNA polymerase  $\alpha$  subunit and acts as a transcription modulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 192.1882-89.

- Rowbury, R. J., M. Goodson & A. D. Wallace. 1992. The PhoE porin and transmission of the chemical stimulus for induction of acid resistance (acid habituation) in *Escherichia coli*. J. Appl. Bacteriol. 72.233-43.
- Ruiz, J., I. Haneburger & K. Jung. 2011. Identification of ArgP and Lrp as transcriptional regulators of *lysP*, the gene encoding the specific lysine permease of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 193.2536-48.
- Sabo, D. L., E. A. Boeker, B. Byers, H. Waron & E. H. Fischer. 1974. Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. Biochemistry 13.662-70.
- Samartzidou, H., M. Mehrazin, Z. Xu, M. J. Benedik & A. H. Delcour. 2003. Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. J. Bacteriol. 185.13-19.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74.5463-67.
- Sayers, E. W., T. Barrett, D. A. Benson, E. Bolton, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio & S. Federhen. 2011. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Res. 39.D38-D51.
- Shi, X., B. C. Waasdorp & G.N. Bennett. 1993. Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by *hns* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175.1182-86.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert & J. Söding. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol. Sys. Biol. 7.
- Sigma. 2003. GenElut Gel Extraction Kit Manual.
- Slonczewski, J. L. & J. W. Foster. 1996. pH-regulated genes and survival at extreme pH. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.1539-49.
- Slonczewski, J. L., B. P. Rosen, J. R. Alger & R. M. Macnab. 1981. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78.6271-75.
- Smits, F., B. Buddingh, M. B van Eldijk & J. van Hest. 2014. Elastin-Like Polypeptide Based Nanoparticles: Design Rationale Toward Nanomedicine. Macromol. Biosci. 15.36-51.
- Soksawatmaekhin, W., A. Kuraishi, K. Sakata, K. Kashiwagi & K. Igarashi. 2004. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 51.1401-12.
- Steffes, C., J. Ellis, J. Wu & B. P. Rosen. 1992. The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. J. Bacteriol. 174.3242-49.
- Stewart, V. 2014. The HAMP signal-conversion domain: static two-state or dynamic three-state? Mol. Microbiol. 91.853-57.
- Stewart, V. & L. Chen. 2010. The S helix mediates signal transmission as a HAMP domain coiled-coil extension in the NarX nitrate sensor from *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 192.734-45.
- Stoller, G., T. Tradler, K. P. Rücknagel, J. Rahfeld & G. Fischer. 1996. An 11.8 kDa proteolytic fragment of the *E. coli* trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. FEBS Lett. 384.117-22.
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189.113-30.
- Swartz, T. E., T. Tseng, M. A. Frederickson, G. Paris, D. J. Comerici, G. Rajashekara, J. H. Kim, M. B. Mudgett, G. A. Splitter & R. A. Ugalde. 2007. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. Science 317.1090-93.
- Takayama, M., T. Ohyama, K. Igarashi & H. Kobayashi. 1994. *Escherichia coli* cad operon functions as a supplier of carbon dioxide. Mol. Microbiol. 11.913-18.

- Taylor, B. L. & I. B. Zhulin. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63.479-506.
- Tetsch, L., C. Koller, A. Dönhöfer & K. Jung. 2011. Detection and function of an intramolecular disulfide bond in the pH-responsive CadC of *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 11.74.
- Tetsch, L., C. Koller, I. Haneburger & K. Jung. 2008. The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol. Microbiol.* 67.570-83.
- Tomitori, H., K. Kashiwagi & K. Igarashi. 2012. Structure and function of polyamine-amino acid antiporters CadB and PotE in *Escherichia coli*. *Amino acids* 42.733-40.
- Tompa, P., Z. Dosztanyi & I. Simon. 2006. Prevalent structural disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* proteomes. *J. Proteome Res.* 5.1996-2000.
- Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76.4350-54.
- Tuckerman, J. R., G. Gonzalez, E. Sousa, X. Wan, J. A. Saito, M. Alam & M. Gilles-Gonzalez. 2009. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* 48.9764-74.
- Ude, S. 2013. The role of elongation factor EF-P in translation and in copy number control of the transcriptional regulator CadC in *Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ude, S., J. Lassak, A. Starosta, T. Kraxenberger, D. Wilson & K. Jung. 2013. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339.82-85.
- Ukaegbu, U., S. Henery & A. C. Rosenzweig. 2006. Biochemical characterization of MmoS, a sensor protein involved in copper-dependent regulation of soluble methane monooxygenase. *Biochemistry* 45.10191-98.
- Ulrich, L. E., E. V. Koonin & I. B. Zhulin. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 13.52-56.
- Urry, D. W., R. Henze, R. D. Harris & K. U. Prasad. 1984. Polypentapeptide of elastin: temperature dependence correlation of elastomeric force and dielectric permittivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125.1082-88.
- Uversky, V. . 2015. Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins. *FEBS J.*
- Uversky, V. N. 2013. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *BBA-Proteins Proteom.* 1834.932-51.
- Uversky, V. N. & A. K. Dunker. 2008. Controlled chaos. *Science* 322.1340-41.
- Vranken, W. F. 2014. NMR structure validation in relation to dynamics and structure determination. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 82.27-38.
- Vranken, W. F., W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides & E. D. Laue. 2005. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59.687-96.
- Watson, N., D. S. Dunyak, E. L. Rosey, J. L. Slonczewski & E. R. Olson. 1992. Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J. Bacteriol.* 174.530-40.
- Weber, K. & M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244.4406-12.
- Williamson, M. P. 2013. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog. Nucl. Mag. Res. SP* 73.1-16.
- Winkler, K., A. Schultz & J. E. Schultz. 2012. The S-helix determines the signal in a Tsr receptor/adenylyl cyclase reporter. *J. Biol. Chem.* 287.15479-88.

- Wishart, D. S. & B. D. Sykes. 1994. The  $^{13}\text{C}$  chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using  $^{13}\text{C}$  chemical-shift data. *J. Biomol. NMR* 4.171-80.
- Wright, P. E. & H. J. Dyson. 1999. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* 293.321-31.
- Yang, Y. & R. R. Isberg. 1997. Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH 6 antigen adhesin by two envelope-associated components. *Mol. Microbiol.* 24.499-510.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira & J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* 33.103-19.
- Zhang, J., R. Sprung, J. Pei, X. Tan, S. Kim, H. Zhu, C.-F. Liu, N. V. Grishin & Y. Zhao. 2009. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Proteomics* 8.215-25.
- Zhulin, I. B., B. L. Taylor & R. Dixon. 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22.331-33.
- Zianni, M., K. Tessanne, M. Merighi, R. Laguna & F. R. Tabita. 2006. Identification of the DNA bases of a DNase I footprint by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. *J. Biomol. Tech.* 17.103.
- Zimm, B. H. 1948. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.* 16.1093-99.



Anhang

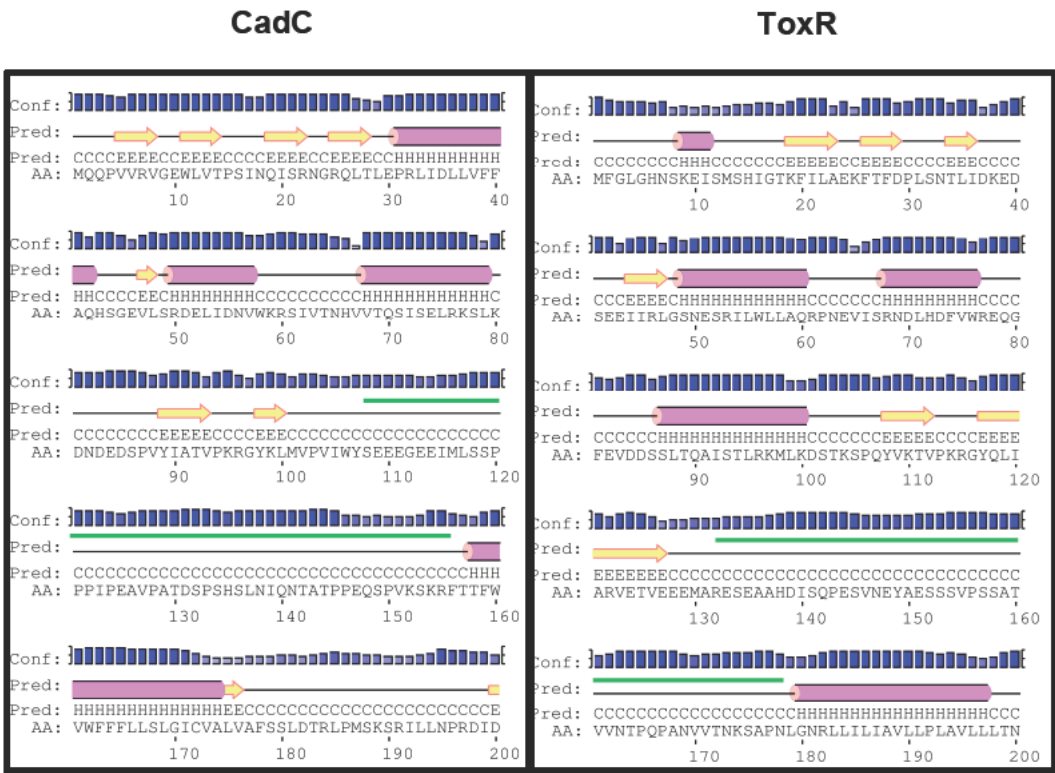




Abb. A1: Computergestützte Sekundärstrukturanalyse von CadC aus *E. coli* und ToxR aus *V. cholerae*. Zu sehen sind die Aminosäuresequenzen (As 1-200) der beiden Organismen. Die zytoplasmatische Linkerregion ist grün markiert. H:  $\alpha$ -Helix (  ), E:  $\beta$ -Faltblatt (  ) und C: „Coil“. Die Sekundärstrukturanalyse wurde mittels PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000) angefertigt.

Cycle#	Curve	Ligand	Sample	Dilution factor	Meas. Conc (M)	Calc. Conc (M)	Flow ( $\mu$ l/min)	Initial rate fit (RU/s)	QC ratio fit	Temp ( $^{\circ}$ C)	MW (Da)	D ( $m^2/s$ )	Blank used	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	SE (Meas. Conc)
<input checked="" type="checkbox"/>	6	Fc=2-1 cadBA-DNA 41er	CadC_1-159	1	1,3E-07	1,3E-07	5	21,7	-0,583	25	18000	1,179E-10	4	2E+02	3,1E-09
<input checked="" type="checkbox"/>	7						100	0,00553					5		
<input checked="" type="checkbox"/>	8	Fc=2-1 cadBA-DNA 41er	CadC_1-159	2	7,2E-08	1,4E-07	5	13,5	-0,0758	25	18000	1,179E-10	4	1,1E+02	9,6E-10
<input checked="" type="checkbox"/>	9						100	11,8					5		
<input checked="" type="checkbox"/>	10	Fc=2-1 cadBA-DNA 41er	CadC_1-159	5	3,2E-08	1,6E-07	5	5,84	0,758	25	18000	1,179E-10	4	1,1E+02	1,3E-10
<input checked="" type="checkbox"/>	11						100	13,4					5		
<input checked="" type="checkbox"/>	12	Fc=2-1 cadBA-DNA 41er	CadC_1-159	10	1,5E-08	1,5E-07	5	2,96		25	18000	1,179E-10	4	33	6,5E-11
<input checked="" type="checkbox"/>	13						100	8,04					5		
<input checked="" type="checkbox"/>	14	Fc=2-1 cadBA-DNA 41er	CadC_1-159	20	7,7E-09	1,5E-07	5	1,5	1	25	18000	1,179E-10	4	14	4,1E-11
<input checked="" type="checkbox"/>	15						100	4,07					5		

Abb. A2: Calibration-free Concentration Analysis zur Bestimmung des Anteils an biologisch aktivem CadC<sub>1-159</sub>-E30R. Dazu wurden 5  $\mu$ M CadC<sub>1-159</sub>-E30R in den Verdünnungsstufen 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 eingesetzt. Die aktive Flusszelle wurde mit *cadBA* -DNA beladen, als Referenz diente *yjiY*-DNA. Die Flussrate lag bei 5  $\mu$ l/min als auch bei 100  $\mu$ l/min. Der Diffusionskoeffizient von CadC<sub>1-159</sub>\_E30R wurde als  $D=1,179 \times 10^{-10} m^2/s$  bestimmt. Die aktive Konzentration von CadC<sub>1-159</sub>\_E30R betrug  $1,5 \times 10^{-7} M$ . Alle Messungen erfolgten in Kooperation mit PD Dr. Ralf Heermann am Department Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität.

```

* CadC_Escherichia_coli      ---MQQPVVVRVGEWLVTSPINQISRNQRQ---LTLEPR---LIDLLVFF 40
* ToxR_Vibrio_cholerae      MSHIGTKFILAERKFTFDPLSNTLIDKEDSEBIIIRLGSN---ESRILWLL 46
OmpR_Escherichia_coli      MQENYNILVVDDDMRLRALLERYLIEQGFQ---VRSVAN---AEQMDRL 44
VirG_Agrobacterium_tumefaciens MKH---VLVIDDDVAMRHLYEYLTIAHFK---VTAVAD---SKQFNRL 41
PhoB_Escherichia_coli      MAR---RILVVEDEAPIREMVCFLVLEQNGFQ---PVEAED---YDSAVNQL 42
VanR_Enterococcus_faecalis MSD---KILIVDDEHEIADLVELYLNENY---VFKYYT---AKEALECI 42
* PsaE_Yersinia_pestis      -----MSHCVVLNKLESVLIIGDSR---YALSKN---EVLILLECL 34
* TcpP_Vibrio_cholerae      MGYVVRVIYQFFDNLWWNECSNQVYYAQDPMKPERLIGTPSIMQAKLLKIL 50
:
:
* CadC_Escherichia_coli      AQHSGEVLRSDELIDNVWKR---IVTNHVVTQSSIS-ELRKSCLKDNDESDP 87
* ToxR_Vibrio_cholerae      AQRPNENVISRNDLHDFVWREQGFVDDSSLTQAIS-TLRKMLKDSTK-SP 94
OmpR_Escherichia_coli      TRSFPHMLVLDLMLF---GEDGLSICRRLRSQSNP---MPIIMVTAKGEEV 89
VirG_Agrobacterium_tumefaciens CSETVQVVVVVDNLG---REDGLEIVRSLATKSDV---PIIIISGARLEEA 86
PhoB_Escherichia_coli      NEFPDILLDWMLF---GSGIQFIKHLKRESMTDIPVVMILTARKEE 89
VanR_Enterococcus_faecalis DKSEIDLAILDMLF---GTSGLTICQKIRDKHTY---PIIMLTGKDETEV 86
* PsaE_Yersinia_pestis      YLRAGDVISHDELLT-----TCWPDREVVSPTS---LFVAIKHIRDVFR 74
* TcpP_Vibrio_cholerae      CEYHPSPCPNDQIIK-----ALWPHGFISSESLTQAIKRTDFLNDHEHK 94
:
:
* CadC_Escherichia_coli      VYIATVPKRGYKIMV VIW----- 107
* ToxR_Vibrio_cholerae      QYVKTVPKRGYQLIARVETVEEEMARESBAAHDISQFESVNEYAESSSVP 144
OmpR_Escherichia_coli      DRIVGLEIGADDYIPKPFNPPELLARIRAVLRQANELPGAFSQEEAVIA 139
VirG_Agrobacterium_tumefaciens DKVIALBLGATDFIAKPFGTREFLARIRVALRVRP---SVARTKDRRSFS 133
PhoB_Escherichia_coli      DRVRGLETGADDYITKPFSPKELVARIKAVMRIS-----PMAVEEVIE 133
VanR_Enterococcus_faecalis DKITGLTIGADDYITKPFRLPLIARVKAQLARYK-KFSGVKEQENNVIV 135
* PsaE_Yersinia_pestis      KITRSEVIKTYKNEGYSYQKDSVLIIIDGSTEKESHSAAYTRKEKPDIP 124
* TcpP_Vibrio_cholerae      TLIENVKLQGYRINI IQVIVSENIVDEADCSQKKS-----VKERIK 135

```

**Abb. A3: Computergestützter Sequenzvergleich von Transkriptionsregulatoren der OmpR-Familie.** Die DNA-Bindedomäne von CadC (As 1-107) aus *Escherichia coli* wurde mit den DNA-Bindedomänen von ToxR aus *Vibrio cholerae*, OmpR aus *Escherichia coli*, VirG aus *Agrobacterium tumefaciens*, PhoB aus *Escherichia coli*, VanR aus *Enterococcus faecalis*, PsaE aus *Yersinia perstis* und TcpP aus *Vibrio cholerae* verglichen. Die Sequenz des  $\beta$ -Strang 7 in CadC aus *E. coli* wurde schwarz markiert. \* kennzeichnet Proteine der ToxR-Familie. Die Aminosäuren im Bereich des  $\beta$ -Strangs aus *E.coli* CadC zeigten keine Sequenzhomologie zu den Aminosäuren aus weiteren Mitgliedern der OmpR-Familie. Der Sequenzvergleich wurde mittels CLUSTALW2 (Larkin *et al.* 2007) angefertigt.

CadC_Vibrio_harveyi	MVGVPYQINDWVLSVDENKLYRQDREVTVPERLINLLHFLAEHASEVFNK	50
CadC_Vibrio_vulnificus	MTGIYFQINDWVLCIDENKLYRQDREVSVEPRLLINLLHFLAEHVGSEVFGK	50
CadC_Vibrio_fischeri	MVGICFQINDWTLVIEENKLYRQDREVSVEPRLLINLLHFLAEHSGSEVFCR	50
CadC_Aeromonas_hydrophila	MSESVEFIHDWTLSDNNMLCRPDREVLYLEPRLLNLLRFLASNAQTVEFGK	50
CadC_Serratia_odorifera	MQQPVFRVGEWLVTANNQISRDGRQKLEPRLLDMLFYFAQHPPDVVLSK	50
CadC_Yersinia_ruckeri	MQEPVFRVGEWLVTADNKISRDGRQKLEPRLLDMLQYFAHHPDVVLSK	50
CadC_Edwardsiella_tarda	MQEQTFRVGEWLVLADNKITREGRVVLVLEPRLLDMLSYFAHHPDVVLSK	50
CadC_Escherichia_coli	MQQPVFRVGEWLVTFSINQISRNGRQKLEPRLLDMLVFFAQHSGSEVLSK	50
CadC_Klebsiella_pneumoniae	MLQPVFRVGEWLVTFSVNOISRKGRQKLEPRLLDMLVFFARHPGEVLSK	50
CadC_Salmonella_enterica	MQQPVFRVGEWLVTFSVNOISRKGRQKLEPRLLDMLVFAHHPDVEVLSK	50
CadC_Shewanella_piezotolerans	MHMQSYRIDNWFFVPHENRLVLDEQEILIDNRLSNLLFLCINPRTTLSK	50
	* : : * : : : : : * : : : : *	
CadC_Vibrio_harveyi	EELIQYVWAGAIVTDQVVTQSIFELRKLLRDGREENISYVITVPKRGYKL	100
CadC_Vibrio_vulnificus	EELIQYVWDGAIVTDQVVTQSIFELRKLLRDGREENLSYVITVPKRGYKL	100
CadC_Vibrio_fischeri	DELIKHVWDGAFVTDQVVTQSIFELRKVLDRGLDNTRYLVTVPKRGYKL	100
CadC_Aeromonas_hydrophila	DCLINEVWDGAIVTDQVVTQSIFELRKILKDRNDADYIVITVPKRGYKL	100
CadC_Serratia_odorifera	DELIDNVWKRNIIVTNHVVTQSISELRLKLDGNGREYIVITVPKRGYKL	100
CadC_Yersinia_ruckeri	DELIDNVWKRNIIVTNHVVTQSISELRLKLDGDSHSPYELITVPKRGYKL	100
CadC_Edwardsiella_tarda	DELIDNVWKRNIIVTNHVVTQSISELRLKLDGRTEAPEYIVITVPKRGYKL	100
CadC_Escherichia_coli	DELIDNVWKRNIIVTNHVVTQSISELRLKLDNDSDSPYIATVPKRGYKL	100
CadC_Klebsiella_pneumoniae	DELIDNVWKRNIIVTNHVVTQSISELRLKLDGDDVSLEYIATVPKRGYKL	100
CadC_Salmonella_enterica	DNIIIDHVWKRNIIVTNHVVTQSISELRLKLDGDDSNAYIIVITVPKRGYKL	100
CadC_Shewanella_piezotolerans	DEIIDHVWKRNIIVTDQVITQAFELRKILKTNNQHLQCYIITVPKRGYKL	100
	: : * : : : : * : : : : * : : : : *	
CadC_Vibrio_harveyi	VANVTMTHEEFLA-----SRHCN-----AEILPPI----	126
CadC_Vibrio_vulnificus	VANVERLTAPYLLRQ-----AEPAE-----VELLEPA----	128
CadC_Vibrio_fischeri	VAETKQIRIDPTPYWKPCDTFTSTAD-----ENQNNHV----	134
CadC_Aeromonas_hydrophila	VAFVRPLQVGS-----VVMAPAG-----DEILSD----	124
CadC_Serratia_odorifera	AAPVMWCER-----ELLPPAA-----PQVAVI----	123
CadC_Yersinia_ruckeri	VAPVMWCER-----KAVIPAV-----PRVAVI----	123
CadC_Edwardsiella_tarda	VEFVLWCNG-----SSELALASATSL-----SSAPLIS----	130
CadC_Escherichia_coli	MVFVIWYSE-----EGEEIML-----SSPPI----	123
CadC_Klebsiella_pneumoniae	TVPVIWCTEGEELAP-----QVEALTP-----SSSTAI----	129
CadC_Salmonella_enterica	TAPVIWCE-----SDEI-----DNSSTSP----	121
CadC_Shewanella_piezotolerans	DTLVEVYNEKTA-----PTVLNAA-----HKIVESN----	127
CadC_Vibrio_harveyi	-----VEEAEQPEAPVP-SIAFFAGP-----LTRAUCE	155
CadC_Vibrio_vulnificus	-----MTEPLIAVEAPSANEMVFEAGP-----LTRANCH	158
CadC_Vibrio_fischeri	-----ELNTEEQEKEQDETAQLSFFAGP-----LTRAFTN	164
CadC_Aeromonas_hydrophila	-----LSPPLAEEDAEAVVTAAPFFAGP-----LTRAISS	154
CadC_Serratia_odorifera	-----THEPEDGCGEDDAQDYIPRP-----AAKPAEP	150
CadC_Yersinia_ruckeri	-----THEPEDGSEDDGDEYEPKRS-----NVTKSAA	150
CadC_Edwardsiella_tarda	-----GRVEASPTAEAPPQTSAPPVSPRTFVEMPVQAQAAEASP	169
CadC_Escherichia_coli	-----PEAVFATDSPSHSLNIQNTATPFEEQS-----PVKS	153
CadC_Klebsiella_pneumoniae	-----PVPAPAGGPPPEADSSADLTAPVTAFAAA-----PAVASAP	165
CadC_Salmonella_enterica	-----PPIAAT-----NAEPTECVTAATDVFPAS-----LQTPFK	152
CadC_Shewanella_piezotolerans	-----AEQKSNFAAKEATKHKKATENEEP-----TTAVES	157
CadC_Vibrio_harveyi	MS-----KEKKAPRKPNISPWRLGLMNFIVISILVVVM	191
CadC_Vibrio_vulnificus	SQ-----QQKK-PNRPNISRWRVNAFNALWIGLVIIAM	192
CadC_Vibrio_fischeri	ISNQVSN-----EKKKQGESFSLHRLWKLAFDFLVGVLIAMI	205
CadC_Aeromonas_hydrophila	HAQ-----DSRWKMGIFDVFVAVILVSI	182
CadC_Serratia_odorifera	ARNGRR-----FYQRSFWVWLSFLAALSACVAFV-GIT	184
CadC_Yersinia_ruckeri	KKSKPS-----FYQRSFWVWVAFALALSTCVVFV-AIT	184
CadC_Edwardsiella_tarda	LSERAA-----ESEVAPLTRIPRYKRSFWVWVAFALTALLCVSEV-GLV	214
CadC_Escherichia_coli	---KRF-----TFWVWFFFLSLGICVALV-AFS	180
CadC_Klebsiella_pneumoniae	SARKRL-----TALVWGLFLLALGTCVALV-ALS	195
CadC_Salmonella_enterica	AKKDRI-----ALFTWVMFLSLATLVVFI-VMV	182
CadC_Shewanella_piezotolerans	AK-----SRFSSSLAIVGALIAVA-VLV	181
CadC_Vibrio_harveyi	FTYKQSEVRITQA-----IDTHLIEFKPDNFSKE-GRS-----YD	226
CadC_Vibrio_vulnificus	FTIKQSQVRITQV-----VDTHLIEFMFQDDYHAQ-ALS-----HD	227
CadC_Vibrio_fischeri	VTYQQTTHITKA-----VDTDLIEFTYHASNNSN-NET-----EY	240
CadC_Aeromonas_hydrophila	LSYQHASPOVQSHM-----LDPDLLVFRFHSMSDGS-NEN-----VR	217
CadC_Serratia_odorifera	LSQRVPVAPMEML-----LNPRDIDIRIQGNSCSNWMPP-----QLS	221
CadC_Yersinia_ruckeri	LSQRVPQSTMEML-----MNPRDIDIRIQGNSCSNHWTS-----QLS	221
CadC_Edwardsiella_tarda	FSNRPVPAPQFML-----LNPRDIDIRIQGNSCSNWTN-----QLS	251
CadC_Escherichia_coli	LDTRLPMKSRIL-----LNPRDIDINMNVN-KSCNSWSSPY-----QLS	218
CadC_Klebsiella_pneumoniae	MESRPPVNKARLL-----LNPRDIDIHVNGNSCANWSS-----OHS	232
CadC_Salmonella_enterica	VDHNAAVTKTRLL-----LNPRDIDVRFEGGNSCANNWVS-----QGS	219
CadC_Shewanella_piezotolerans	FFNRADIGKQPSVEHVYADLEPRVIEASIDNS-----LAN-----	217



CadC_Vibrio_harveyi	LADGFAQKLMADVAQVSDYRVMLKRAFTT---GIVPGKSVVVRVREND	272
CadC_Vibrio_vulnificus	LADGIAQKLMADITQVTDYRVMLSKTAFTS---GILPGKSIMVRVSDKE	273
CadC_Vibrio_fischeri	LADGISQKLMADLASVGHYRVQLNKTAFTT---GILPGKAVNVVRVERQQ	286
CadC_Aeromonas_hydrophila	LADGITRALMGEVAAATPLRVQYQANTLMG---GILPGKELSVVRVSRQP	263
CadC_Serratia_odorifera	YVVGLSELIADSLNTYSTFLVHDQCTNYNYG---GPSSSGKSLTIEFVNQR	268
CadC_Yersinia_ruckeri	YVAGLSEVVTDLSLNTYSTFLVHDQCTNYNYT---GPSSSGKSLTIEFVNQR	268
CadC_Edwardsiella_tarda	YVVGLSEELTQGLNTYSTFLVHDQCTNYNYG---GPSSSGKSLYIEFVNQR	298
CadC_Escherichia_coli	YAIGVGDIVATSLNTFSTFMVHDKINYNID---EPSSSGKTLIAFVNQR	265
CadC_Klebsiella_pneumoniae	YAVGLASLITTSLNTFSTFMVHDKTDYNIN---EPSSSGKTLTIEFVNQR	279
CadC_Salmonella_enterica	YAIGLGGLITDLLNTYSTFMVHDKTNYRVN---EPSSSGKTLTIOFVNQR	266
CadC_Shewanella_piezotolerans	--ASLQNGVIFKVIIEYLYKYNVNYRVSFNPK---DHLLAAKRLSFIVTREND	262
	.. : : *	..* : . . :
CadC_Vibrio_harveyi	GG---SFLEVEYRNNSSEKVLFSROYALTNSHLKSVMOOASIDLMRALK	318
CadC_Vibrio_vulnificus	GH---AFIELELKNSSCAVLFSSRQYPLDTSHLASVLHRAEVDIMQALR	319
CadC_Vibrio_fischeri	NK---TYLDVEYRGNISNRVLFSSRQYLMTANLEHVLQRSSQDLMRALG	332
CadC_Aeromonas_hydrophila	GG---TYLDLEYRNINTNRVLFSSHQYQLSRHNVHGVQLQASSQDLRLALD	309
CadC_Serratia_odorifera	HYRAQQCFSLSVKLVDNADSAIMLDKRYFITTDNQLKIQADLLNSMSVALK	318
CadC_Edwardsiella_tarda	HYRAQQCFSLSVRLVDNADSSIMLDKRYFVTADNQLKIQEDFLSSLSIALK	318
CadC_Escherichia_coli	HYRAQQCFSLSVRLVDNADNSVMLEKRYFITPDNLLSVQKDFVDSIFSVLK	348
CadC_Klebsiella_pneumoniae	QYRAQQCFMSLKLVDNADGSTMLDKRYVITNGNQLAIQNLLSLSKALN	315
CadC_Salmonella_enterica	HYRAQQCFMSVQLVDNADSSIMLDKRYFVTNDNQLTQNDLMSLSLDAIT	329
CadC_Shewanella_piezotolerans	HYRTQQCFMSVVLIDNADGSTMLDKRYFVTNTNQLSIQDDLPNSLSFVLT	316
	GI---DYVNIIEYFNKISNYQHLDKRYPISEKHLKHSIKLIMDDVLDAFN	308
	::: . : : * : : : : : :	
CadC_Vibrio_harveyi	VPDAKRLSKVLVAGMFMNPDVAVELFVEANHYLNVSANQFHHGIDLMERI	368
CadC_Vibrio_vulnificus	LPNAEQQAQILLVDFFQQPAALALYVRANHYLNLSDDQQVQKIGIDLLEQV	369
CadC_Vibrio_fischeri	VOASEODMNRMLGLFKEHGLLEMLVRANHFINTDOKNFEKGIDLENI	352
CadC_Aeromonas_hydrophila	QP-----DVLPGMGWETDDGALMAMMEAHYYINSQDPVALRRGVLELDKS	384
CadC_Serratia_odorifera	QPWPPLQLKRLNDVLFQCGPALQQFYQAHQLLIQGDVESLTRASLLSAL	368
CadC_Yersinia_ruckeri	QPWPAALQQRLLQLLENSSGPVLQCYQAHQFLIQGDDSLTHASSMLGEM	368
CadC_Edwardsiella_tarda	VKMPPLALRYDTLTVETHSOMLQOYYOAHOLLQGDGSELNOANRLLAOL	398
CadC_Escherichia_coli	QPWPQRMQETIKLILPHRGALLTNFYQAHQDYLLHGGDKSLNRASLLGEI	365
CadC_Klebsiella_pneumoniae	QPWPARMQANLRQYQFSQSVALTYFYQSHQLLMKGDVDSLKASLLDDV	379
CadC_Salmonella_enterica	QPWPNRMEQLALFRTPQNTALMRFYEARQLILSGDAQALGKASDILNGI	366
CadC_Shewanella_piezotolerans	IDIAKSEIDLVLDMPEEPAALALSLEAIGTLHSYDKQF--DAIDLLAKA	356
	. . . . . *	..
	. . . . . *	..
CadC_Vibrio_harveyi	LELEPDNAYVOAELLIAHYVONALDPALELRK--GRVOOLSEKLETNTKM	416
CadC_Vibrio_vulnificus	LNLEPNNHVYQAEELLIAHYVQQALESMPPLNQ--ERILLSSSKLQSASEA	417
CadC_Vibrio_fischeri	ALAEPNNDYVLSLEYIAYNAYSALNFELELDENTAKIEKLSQDQARYAL	432
CadC_Aeromonas_hydrophila	LASQPDQPLLLAERYLAG---EALATLTGTPQS--ERLQGICAHLASV--V	398
CadC_Serratia_odorifera	MMSAPDFIYSGAEKALVD--VLRNSYQPFDSQSSQQLRDEISREKLPQL	416
CadC_Yersinia_ruckeri	IKSSPDFIYVAAEKALVD--LLRHSYQPFDPVQLALRTEIVYLDLPLAL	416
CadC_Edwardsiella_tarda	IKQDPDFVYAKAEKALVD--ILLNSYQPLSAPQLTALRQEIENEVEQNKL	446
CadC_Escherichia_coli	VOSSPEFTYARAEEKALVD--IVRHSQHPLDEKQLAALNTEIDNIVTLPKL	413
CadC_Klebsiella_pneumoniae	IKRAPDFIYAYAEKTLVD--VLRHSQQPLDDKQLAALYSEVERVCEMPGI	427
CadC_Salmonella_enterica	IKETPDFNYAYEYKVLVD--VLRQSQQPFDEKQVAALNEEFKKIDQIPGV	414
CadC_Shewanella_piezotolerans	LEIDPTSHYLLSMNYIYNMTIAYLGRSNLSIDSINSLSNDFEQI--LPQI	404
	* : : :	
CadC_Vibrio_harveyi	MVCPIQP---RIYEALALNETIAGDIDLAKQHLNQALEIRDSVLSYVIRG	463
CadC_Vibrio_vulnificus	LDVAVQP---RIYEALALQATVDEDLPSAERYLAKAQQLRESVLSYVLQG	464
CadC_Vibrio_fischeri	SDVGVLPS---RIYEALAMIAIKQDNFEDARAYLNLAFKKNRESAFSYILEG	440
CadC_Aeromonas_hydrophila	RDQAALPA--RVWEALTQAILNGQQQEAIRLLAERASRGRSVLYHILRG	486
CadC_Serratia_odorifera	QDSPI-----LOOIYTVREALGGRIDDAYRAINKAIDMOMSWINYVLLG	460
CadC_Yersinia_ruckeri	KDSPI-----IQQIHTIQALGEGKTDEAYQAIHKGIEQLQMSWMNYVLLG	460
CadC_Edwardsiella_tarda	QGTPI-----IQOIYTVYDLGGQKVEQAFAINKGIELEMSWLNLYVLLG	490
CadC_Escherichia_coli	NNLSI-----IYQIKAVSALVKGKTDESYQAINTGIDLEMSWLNLYVLLG	457
CadC_Klebsiella_pneumoniae	KDMAI-----YYQIKAVDSLKGKGVDEANTAINSAIDLEMSWLNLYVLLG	471
CadC_Salmonella_enterica	EKTSV-----YYRIKTVDLLKGKGDIDAAEYRINKSIELEMSWLNLYVLLG	458
CadC_Shewanella_piezotolerans	SESPESEFK---VYEAMALHALSKDLPIEAVQHLNQIPHHTNTIMTYILRA	451
	: : : : : :	
CadC_Vibrio_harveyi	KHAELDGLDWDASESYSEAFYIDTSVETYLLENLVFPSPNMKADYAMR	513
CadC_Vibrio_vulnificus	KHAELRGDLQASDGYSEAFYMDTSLITYLLCERLVFQSNLKSIDYAMR	514
CadC_Vibrio_fischeri	KLAELDGLDQAGESSYKAFMDTSLITYMLAENLAFYSLETVAIFYMYR	530
CadC_Aeromonas_hydrophila	KLAELDGRPEAGDAYSOAFLMEATEOTYLLCOOLGFYSNMETLTPALFN	496
CadC_Serratia_odorifera	KVYEMQGNHLAADSYITAFNLRPGENTLHWIRNGVFQTSISAVVPYLSH	510
CadC_Yersinia_ruckeri	KVYEMQGNHLAADAYITAFNLRPGENTLHWIRNAVFHTSIYTVVPYLDN	510
CadC_Edwardsiella_tarda	KVYELKGQNNQADAYITAFNLRPGNNTLYWIKNGVFQTNIERVAPYLLN	540
CadC_Escherichia_coli	KVYEMKGMNREAADAYLTAFNLRPGANTLYWIEINGIFQTSVPYVVPYLDK	507
CadC_Klebsiella_pneumoniae	KVYEMKGNHLAADSYITAFNLRPGGDTLYWIEINGVFQTSVNRVPYLDN	521
CadC_Salmonella_enterica	KVYEMKGNRLAADAYLTAFNLRPGENTLYWIEINGVFQTSVQKTVPYLNS	508
CadC_Shewanella_piezotolerans	KLAESFGNPASAEFFYQALHESGTFRVLDFAESLLFYSDLSKMRLLKLS	501
	* * * : * * : . . * : : :	

CadC_Vibrio_harveyi	AVHPSVVRML- 523
CadC_Vibrio_vulnificus	SVHPSVVRML- 524
CadC_Vibrio_fischeri	AVNPSEYRLMG 541
CadC_Aeromonas_hydrophila	ALGQSKVKLF- 506
CadC_Serratia_odorifera	YDADK----- 515
CadC_Yersinia_ruckeri	YTPNK----- 515
CadC_Edwardsiella_tarda	YDAEKIE---- 547
CadC_Escherichia_coli	FLASE----- 512
CadC_Klebsiella_pneumoniae	FLSSE----- 526
CadC_Salmonella_enterica	FLAED----- 513
CadC_Shewanella_piezotolerans	QLESVVEDQNK 512

**Abb. A4: Computergestützter Sequenzvergleich von CadC aus *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio fischeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia odorifera*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* und *Shewanella piezotolerans*.** Der Bereich der DNA-Bindedomäne ist blau, die Linkerregion rot, der Bereich der Transmembranhelix grau und die Sensordomäne grün markiert. Sequenzhomologie wurde für die DNA-Bindedomäne und die periplasmatische Sensordomäne festgestellt, die Aminosäuresequenz der Linkerregion ist nicht konserviert. Der Sequenzvergleich wurde mittels CLUSTALW2 (Larkin *et al.* 2007) angefertigt.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kirsten Jung für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren, für ihre große Diskussionsbereitschaft und die exzellenten Ratschläge sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem möchte ich ihr für die Möglichkeit danken, an wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen und diese Arbeit in Kooperation mit anderen Wissenschaftlern durchzuführen.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Marc Bramkamp bedanken, der sich als Zweitgutachter meiner Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei den Kooperationspartnern vom Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie der Technischen Universität München, Prof. Dr. Michael Sattler und Dr. Andreas Schlundt für die Zusammenarbeit bei der NMR-Analyse und der Kristallisation von  $\text{CadC}_{1-107}$ .

Ebenso möchte ich mich beim Exzellenzcluster CiPSM (Center of Integrated Protein Science Munich) für die Unterstützung bei der Finanzierung von Dienstreisen und der finanziellen Hilfe beim Kauf von Sachmitteln bedanken. Die Möglichkeit mich als Assistenz der Frauenförderung einzubringen, hat mir stets Freude gemacht.

Auch vielen Dank an PD Dr. Ralf Heermann für die kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Jürgen Lassak, der mich durch exzellente Ratschläge und Denkanstöße immer wieder neu motivieren konnte.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Heinrich Jung, Dr. Frank Landgraf, Dr. Laure Plener, Korinna Burdack, Ingrid Weitzl, Sabine Scheu, Poldi Fried, Matthias Reiger, Ina Haneburger, Nicola Lorenz, Hannah Schramke, Yang Wang, Magdalena Motz, Wolfram Volkwein, Sophie Brameyer, Angela Gläser, Elaine Rabener, Ivica Kristoficova, Claudia Vilhena, Susanne Bracher, Michelle Eder und Felix Becker für die gemeinsame Zeit!

Danke an meine Kuscheibüro-Mitbestreiter Stefan, Martina und Susi (und die Schoko-Motivations-Schublade) -ihr seid die Besten!

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern Karl und Susanne Buchner, sowie meiner Schwester Mia Buchner. Eure bedingungslose Liebe und euer Vertrauen waren und sind stets der größter Halt in meinem Leben. Danke, Danke, Danke - ohne euch wäre all das nicht möglich gewesen!